

T-1005-21/110

Facultad de Ciencias
UNIVERSIDAD DE GRANADA

T
16
69

ELIMINACION BIOLÓGICA DE ALTAS CONCENTRACIONES DE NITRATO EN
EFLUENTES DE FABRICACION DE EXPLOSIVOS

Guadalupe Piñar Larrubia
1998



Facultad de Ciencias
UNIVERSIDAD DE GRANADA

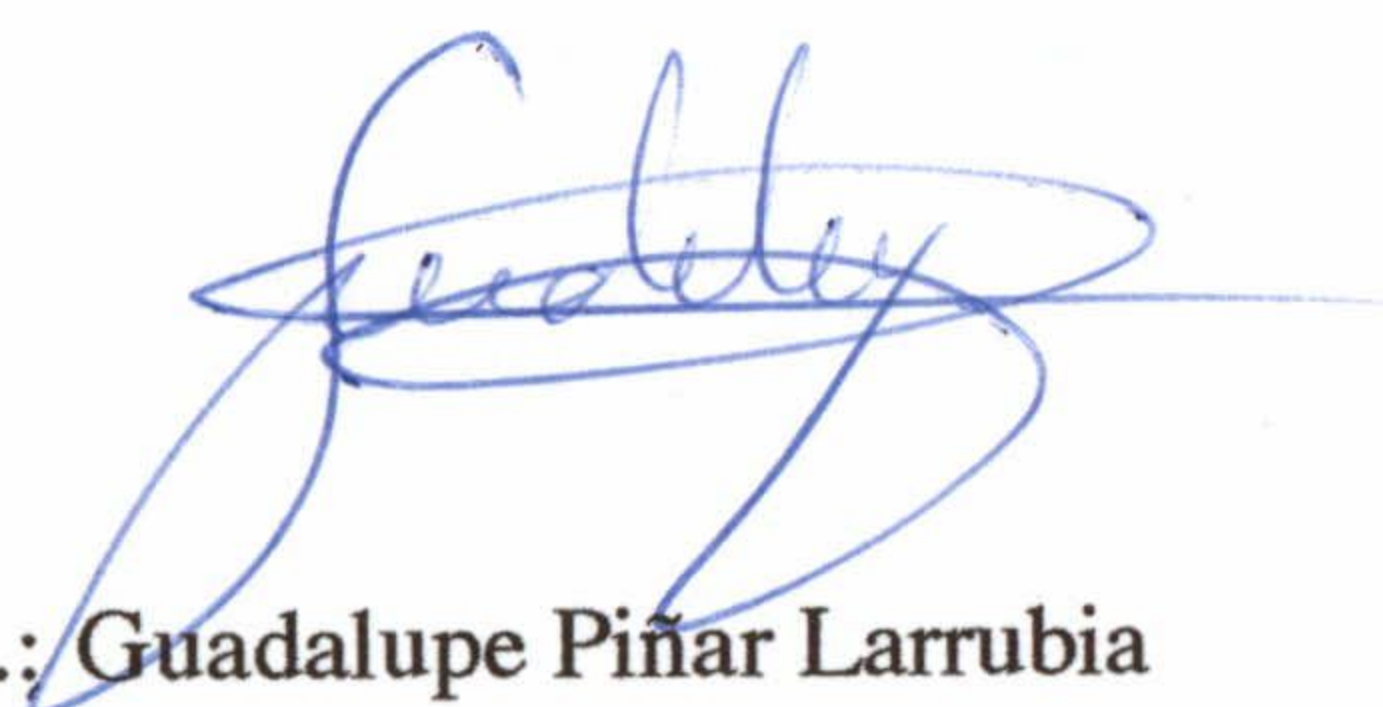
UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha 3-12-97
ENTRADA NUM. 4471

ELIMINACION BIOLÓGICA DE ALTAS CONCENTRACIONES DE NITRATO EN
EFLUENTES DE FABRICACION DE EXPLOSIVOS

Guadalupe Piñar Larrubia
1998

ELIMINACION BIOLÓGICA DE ALTAS CONCENTRACIONES DE NITRATO EN
EFLUENTES DE FABRICACION DE EXPLOSIVOS

Memoria que presenta la Licenciada en
Biología Guadalupe Piñar Larrubia
para aspirar al Título de Doctor



Fdo.: Guadalupe Piñar Larrubia

VºBº

El Director



Fdo.: Juan Luis Ramos Martín
Doctor en Biología
Investigador Científico del C.S.I.C

Universidad de Granada

1998

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en la
Unidad Estructural de Bioquímica y Biología
Molecular y Celular de Plantas de la Estación
Experimental del Zaidín (C.S.I.C), Granada.



Faint, illegible text, possibly bleed-through from the reverse side of the page.

Handwritten text in a rectangular box, possibly a signature or date, located in the bottom left corner.

Al finalizar este trabajo de Tesis Doctoral quiero expresar mi agradecimiento a las personas que de algún modo han contribuido a su realización:

Al Dr. Juan Luis Ramos, director de este trabajo, por la confianza que ha depositado en mi durante estos años, por las oportunidades que me ha brindado para completar mi formación y por todo lo que he aprendido de él formando parte de su grupo de investigación.

A Unión Española de Explosivos que a través de su colaboración y apoyo al grupo de Degradación de Tóxicos orgánicos de la Estación Experimental del Zaidín ha hecho posible la realización de esta investigación.

A Jose Miguel Oliva y Luis Sánchez-Barbero por su constante seguimiento e interés en la realización de este trabajo.

A Victor Calvo, por su colaboración en el trabajo realizado en la planta piloto instalada en la Fábrica de Paramo de Masa (Burgos), perteneciente a Unión Española de Explosivos. Al resto del personal de la fábrica y en especial a Elena Valderrama, que hicieron que mi estancia en Burgos fuera agradable.

A MAPFRE por haber financiado parte de este trabajo de investigación con una beca perteneciente al convenio CSIC-MAPFRE.

Al Dr. Thomas Egli por aceptarme en su grupo de investigación en el "Swiss Federal Institute for Environmental Science and Technology" (EAWAG), y por todo lo que he aprendido durante mis dos estancias cortas en su laboratorio. A la Dra. Karin Kovarova por su valiosa enseñanza acerca de los cultivos continuos y por su interés y apoyo durante mi estancia en Suiza. A Hans-Peter Früsclin y Vaclav Chaloupka por su ayuda técnica con los fermentadores, y a Austin, Roald, Albert, Winni, Henny, y a un largo etc que incluye a todo el personal del Departamento de Microbiología en EAWAG, que han hecho que mi estancia en Suiza sea inolvidable.

A Estrella Duque, Ali Haïdour, y M^a Dolores Fandila por su colaboración en el aislamiento y caracterización de las cepas utilizadas en este trabajo y por toda la información y ayuda que me han prestado.

A Asun, Dori y Miguel, sin duda las tres personas que más me han apoyado y ayudado durante estos últimos años, por tantos buenos y malos momentos compartidos y por los que aún nos quedan por compartir. Por cierto.....tenemos pendiente una sopa de cebolla!!

A Konrad, por su apoyo y su cercanía constante aun estando a muchos kilómetros de distancia, y por pensar que soy la persona más inteligente del mundo aunque no hable alemán. Danke!!

A Silvia Marqués, Mari Trini Gallegos, Carmina Michán, Cayo Ramos, y Mariam Sahrawy por sus “sabios” consejos y por la disponibilidad que siempre me han mostrado.

A Mari Carmen, Chechu, Mari Angeles y Mati, mis “compañeros de promoción” con los que he pasado tan buenos momentos durante todos estos años, y tantos “agobios” al final, a todos ellos, Gracias y Suerte!!, creo que la vamos a necesitar!!

A Mari Jose, Coral y Lázaro, con los que he conectado tan bien durante estos últimos años, por esforzarse en hacerme más llevadera la escritura de mi Tesis, y por hacerme reir en tantas ocasiones.

Al resto de mis compañeros del grupo de Biodegradación, ya que todos y cada uno de ellos han puesto su granito de arena en la realización de este trabajo, por el apoyo que siempre me han prestado, y por el ambiente agradable que hemos compartido, tanto dentro como fuera del laboratorio.

A los niños del Bar del Zaidín, por permitirme estar en su lista de morosos y no mandarme al cobrador del Frack, y por levantarme el ánimo en numerosas ocasiones.

A los “Pos-it amarillos”, via de comunicación muy superior al e-mail, fax, o teléfono, y que han contribuido a la realización de esta Tesis.

De un modo muy especial a mi padre, mis hermanos, Luis, Floren, Pili y Jose, y respectivos “cuñados” que nunca dudaron que sería capaz de realizar este trabajo, y que algún día llegaría a ser una “Doctora”.

A todos, GRACIAS.

Esta Tesis está especialmente dedicada a mi padre, y al recuerdo de mi madre, quien siempre pensó que yo era capaz de todo y nunca dudó que llegaría a terminarla, pero no vivió el tiempo necesario para poder verlo.



INDICE



INDICE	i
ABREVIATURAS	ix
INTRODUCCION	1
1. Ciclo del nitrógeno	3
1.1. Fijación de nitrógeno.....	4
1.2. Utilización del nitrógeno fijado	5
1.3. Transformaciones de nitrógeno orgánico por las cuales se forma amoníaco	7
1.4. Nitrificación	7
1.5. Desnitrificación	8
1.5.1. Regulación de la síntesis de nitrato reductasa y nitrito reductasa respiratorias.....	9
1.5.2. Importancia ecológica de la desnitrificación.....	10
1.6. Asimilación de nitrato por los microorganismos.....	11
1.6.1. Asimilación de nitrato en enterobacterias	11
1.6.1.1. Genes estructurales del operón <i>nas</i>	12
1.6.1.2. Regulación de la síntesis de nitrato reductasa y nitrito reductasa asimilatorias	13
1.6.1.2.1. La proteína NASR.....	13
1.6.1.2.2. La región reguladora del operón <i>nas</i> FEDCBA.....	14
1.6.2. Asimilación de nitrato en bacterias gram-positivas	14
2. Efectos tóxicos del nitrato y nitrito	16
3. Tratamientos para la eliminación de nitrógeno en aguas residuales	17
3.1. Sistemas combinados de nitrificación-desnitrificación	19
3.2. Sistemas de dos fases para la nitrificación y la desnitrificación	20
3.2.1. Equipos para nitrificación.....	21
3.2.1.1. Equipos con biomasa no adherida.....	21
3.2.1.1.1. Unidades de lodos activos.....	21
3.2.1.1.2. Equipos con biomasa adherida	21
3.2.1.1.2.1. Filtros percoladores	22
3.2.1.1.2.2. Filtros sumergidos.....	22
3.2.1.1.2.3. Biodiscos	23

3.2.1.2.4. Reactores de lecho fluido.....	23
3.2.1.2.5. Reactores de corriente de aire (“air-lift”)	24
3.2.2. Equipos para desnitrificación	24
3.2.2.1. Equipos con biomasa en suspensión	25
3.2.2.1.1. Contacto anóxico.....	25
3.2.2.1.2. Reactores tipo UASB.....	25
3.2.2.2. Equipos con biomasa adherida.....	25
3.2.2.2.1. Filtro anóxico.....	25
3.2.2.2.2. Lecho fluido	26
4. Tratamientos para la eliminación de altas concentraciones de nitrato.....	26
4.1. Tratamientos no biológicos	27
4.1.1. Intercambio iónico	27
4.1.2. Reducción química con azúcares	27
4.2. Tratamiento biológico (desnitrificación).....	28
OBJETIVOS	29
MATERIALES Y METODOS	33
1. Cepas bacterianas.....	35
2. Conservación de cepas bacterianas.....	35
3. Medios de cultivo.....	35
3.1. Medios ricos	35
3.2. Medios mínimos.....	37
3.2.1. Cultivos estancos.....	37
3.2.2. Cultivos continuos	37
3.3. Antibióticos	38
4. Condiciones de cultivo.....	38
4.1. Cultivos estancos.....	38
4.2 Cultivos continuos	38
5. Enriquecimiento, aislamiento y caracterización de bacterias indígenas del suelo.....	38
5.1. Enriquecimiento y aislamiento de bacterias	38
5.2. Identificación y caracterización de bacterias aisladas de suelos.....	39
6. Determinación de la biomasa bacteriana	39

7. Plásmidos	39
8. Aislamiento de ADN plasmídico	40
8.1. Método de la lisis alcalina.....	41
8.1.1. Aislamiento de plásmidos a pequeña escala	41
8.1.2. Aislamiento de plásmidos por el método “Quiapreps”	42
9. Transformación de <i>Escherichia coli</i>	43
9.1. Preparación de células competentes	43
9.2. Transformación	43
10. Transferencia de plásmidos por conjugación	44
11. Manipulación de ADN	44
11.1. Determinación de la concentración de ADN.....	44
11.2. Restricción de ADN.....	45
11.3. Separación de moléculas de ADN mediante electroforesis en gel de agarosa.....	45
11.4. Recuperación de moléculas de ADN de geles de agarosa	46
11.5. Ligación de ADN.....	46
11.6. Hibridación de ADN.....	46
11.6.1. Transferencia de ADN.....	47
11.6.2. Marcaje de ADN lineal.....	47
11.6.3. Prehibridación e hibridación	48
11.6.4. Reacción inmunológica.....	48
12. Preparación de extractos libres de células	49
13. Medida de actividades enzimáticas	49
13.1. Ensayo de la actividad nitrito reductasa en <i>Klebsiella oxytoca</i> CECT 4460.....	49
13.1.1 Ensayos <i>in situ</i>	49
13.1.2. Ensayos <i>in vitro</i>	50
13.2. Ensayo de la actividad nitrato reductasa en <i>Klebsiella oxytoca</i> CECT 4460.....	50
13.1.1 Ensayos <i>in situ</i>	50
13.1.2. Ensayos <i>in vitro</i>	51
13.3. Ensayo de la actividad nitrato reductasa en <i>Arthrobacter globiformis</i> CECT 4500.....	51
14. Métodos analíticos	51
14.1. Determinación de nitrato.....	51
14.2. Determinación de nitrito	52

14.3. Determinación de amonio.....	52
14.4. Determinación de glicerol.....	53
14.5. Determinación de sacarosa.....	53
14.6. Determinación de etilenglicol.....	54
14.7. Determinación del carbono orgánico disuelto total.....	54
14.8. Determinación de acetato.....	55
14.9. Determinación de proteínas.....	55
14.10. Determinación del contenido en C y N en la biomasa	55
15. Microscopía electrónica.....	55
RESULTADOS	57
I. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE BACTERIAS TOLERANTES A ALTAS CONCENTRACIONES DE NITRATO	59
Resumen	59
1. Aislamiento y caracterización de bacterias tolerantes a altas concentraciones de nitrato y capaces de utilizar éste como única fuente de nitrógeno.....	60
1.1. Enriquecimiento de microorganismos que utilizan NO ₃ ⁻ como fuente de nitrógeno	60
1.1.1 Con glicerol como única fuente de carbono.....	60
1.1.2. Con etilenglicol como única fuente de carbono.....	61
1.2. Caracterización de las cepas seleccionadas.....	61
1.3. Ultraestructura de <i>Klebsiella oxytoca</i> CECT 4460 y <i>Arthrobacter globiformis</i> CECT 4500	62
2. <i>Klebsiella oxytoca</i> CECT 4460 y <i>Arthrobacter globiformis</i> CECT 4500 toleran altas concentraciones de nitrato	66
2.1. Tolerancia a nitrato por <i>Klebsiella oxytoca</i> CECT 4460 y otras bacterias gram-negativas	66
2.2. Tolerancia a nitrato por <i>Arthrobacter globiformis</i> CECT 4500 y otra bacterias gram-positivas.....	67
3. Optimización de las condiciones de crecimiento en cultivos estancos en fermentadores de 2 L.....	68
3.1. Optimización de las condiciones de crecimiento para <i>Klebsiella oxytoca</i> CECT 4460.....	69

3.1.1. Efecto de la agitación sobre el crecimiento de <i>K. oxytoca</i> CECT 4460.....	69
3.1.1.1. Ensayos en condiciones anaeróbicas	69
3.1.1.2. Ensayos en condiciones aeróbicas	70
3.1.2. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento de <i>K. oxytoca</i> CECT 4460.....	73
3.1.2.1. Ensayos en condiciones anaeróbicas	73
3.1.2.2. Ensayos en condiciones aeróbicas	74
3.1.3. Efecto del pH sobre el crecimiento de <i>K. oxytoca</i> CECT 4460.....	76
3.1.3.1. Ensayos en condiciones anaeróbicas	76
3.1.3.2. Ensayos en condiciones aeróbicas	77
3.2. Optimización de las condiciones de crecimiento para <i>Arthrobacter</i> <i>globiformis</i> CECT 4500.....	79
3.2.1. Efecto de la agitación sobre el crecimiento de <i>A. globiformis</i> CECT 4500.....	79
3.2.2. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento de <i>A. globiformis</i> CECT 4500.....	80
3.2.3. Efecto del pH sobre el crecimiento de <i>A. globiformis</i> CECT 4500.....	82
4. Optimización de la concentración inicial de nitrato en cultivos estancos.....	83
4.1. <i>Klebsiella oxytoca</i> CECT 4460	83
4.2. <i>Arthrobacter globiformis</i> CECT 4500.....	86
5. Optimización de las condiciones nutricionales en cultivos estancos en fermentadores de 2 L.....	89
5.1. Disminución del tampón fosfato y micronutrientes en el medio de cultivo	90
5.2. Utilización de fuentes alternativas de carbono de bajo coste económico	91
 II. ESCALADO DEL SISTEMA DE ELIMINACION DE NITRATO A UNA PLANTA PILOTO DE 40 L DE CAPACIDAD OPERADA EN UNA FABRICA DE PRODUCCION DE EXPLOSIVOS	 95
 Resumen.....	 95

1. Eliminación de nitrato en cultivos estancos en una planta piloto de 40 L de capacidad	96
1.1. Utilización de aguas subterráneas para la dilución de las aguas residuales procedentes de la producción de dinitroetilenglicol	96
1.2. Efecto de la disminución de nutrientes en el medio de cultivo sobre la eliminación de nitrato en una planta piloto de 40 L de capacidad.....	98
2. Establecimiento de cultivos continuos en la planta piloto de 40 L de capacidad	100
2.1. Cultivos continuos de <i>Klebsiella oxytoca</i> CECT 4460	100
2.2. Cultivos continuos de <i>Arthrobacter globiformis</i> CECT 4500.....	101
III. INFLUENCIA DE LA FUENTE DE CARBONO SOBRE LA ELIMINACION DE NITRATO EN CULTIVOS ESTANCOS Y CONTINUOS DE <i>KLEBSIELLA OXYTOCA</i> CECT 4460	105
Resumen	105
1. Cultivos estancos	106
1.1. Determinación de la tasa máxima de crecimiento en cultivos estancos de <i>Klebsiella oxytoca</i> CECT 4460.....	106
1.2. Crecimiento de <i>Klebsiella oxytoca</i> CECT 4460 en cultivos estancos con mezcla de sacarosa y glicerol como fuente de carbono	106
1.3. Crecimiento de <i>Klebsiella oxytoca</i> CECT 4460 en cultivos estancos con mezcla de glucosa y glicerol como fuente de carbono	110
2. Cultivos continuos	112
2.1. Cinética del crecimiento de <i>Klebsiella oxytoca</i> CECT 4460 en cultivos continuos utilizando glicerol como única fuente de carbono.....	112
2.2 Crecimiento de <i>Klebsiella oxytoca</i> CECT 4460 en cultivos continuos con mezclas de glicerol y sacarosa como fuente de carbono	112
2.3. Cinética del crecimiento de <i>Klebsiella oxytoca</i> CECT 4460 en cultivos continuos utilizando sacarosa como única fuente de carbono.....	116
2.4. Consumo de sacarosa bajo condiciones de estado-transitorio en cultivos continuos con glicerol	118
2.5. Determinación de la razón C/N óptima para la eliminación de nitrato en quimiostatos.....	120
2.5.1. Determinación de la zona de doble limitación C/N de crecimiento en cultivos continuos de <i>K. oxytoca</i> CECT 4460 ..	120

- 2.5.2. Utilización de la técnica del “pulso” para la validación de la razón C/N óptima para el sistema de eliminación de nitrato en cultivos continuos de *K. oxytoca* CECT 4460 123

IV. INCREMENTO DE LA DOSIS GENICA DE NITRITO REDUCTASA EN *KLEBSIELLA OXYTOCA* CECT 4460 PARA FAVORECER LA ELIMINACION DE ALTAS CONCENTRACIONES DE NITRATO 125

Resumen..... 125

1. Actividad nitrato reductasa y nitrito reductasa en extractos celulares de *Klebsiella oxytoca* CECT 4460 126

1.1. Optimización de la concentración de nitrito en la mezcla de ensayo para la determinación de la actividad nitrito reductasa 126

1.2. Determinación de la actividad nitrito reductasa y nitrato reductasa en extractos celulares de *K. oxytoca* CECT 4460 127

2. Transferencia del gen *nasB* de *Klebsiella pneumoniae* a *Klebsiella oxytoca* CECT 4460..... 128

2.1. Construcción de los plásmidos pUPE2 y pUPE3 128

2.2. Introducción de *nasB* en *Klebsiella oxytoca* CECT 4460..... 130

2.3. Determinación de la actividad nitrito reductasa y nitrato reductasa en extractos celulares..... 130

2.4. Efecto de la dosis génica de *nasB* en *Klebsiella oxytoca* CECT 4460, sobre la acumulación de nitrito y amonio en el medio de cultivo 131

2.5. Estabilidad del plásmido pUPE2 en ausencia de presión selectiva..... 134

3. Introducción de una copia extra de *nasB* en el cromosoma de *Klebsiella oxytoca* CECT 4460..... 135

3.1. Utilización de minitransposones para la inserción de *nasB* en el cromosoma de *K. oxytoca* CECT 4460 135

3.2. Estabilidad de la copia extra del gen *nasB* en el cromosoma de *K. oxytoca* CECT 4460 137

3.3. Efecto de la copia extra de *nasB* en el cromosoma de *K. oxytoca* CECT 4460 sobre la acumulación de nitrito en el medio de cultivo 138

DISCUSION	139
1. Aislamiento y caracterización de bacterias tolerantes a altas concentraciones de nitrato	142
2. Optimización del sistema de eliminación de nitrato	144
2.1. A escala de laboratorio en fermentadores de 2 L	144
2.2. Escalado a una planta piloto de 40 L de capacidad	146
2.3. Producción de biomasa.....	149
3. Efecto de la fuente de carbono sobre la eliminación de nitrato y determinación de la razón C/N óptima	150
3.1. Cinética de crecimiento de <i>Klebsiella oxytoca</i> CECT 4460 en cultivos estancos	151
3.2. Cinética de crecimiento de <i>Klebsiella oxytoca</i> CECT 4460 en cultivos continuos.....	153
3.3. Determinación de la razón C/N óptima para el sistema de eliminación de altas cargas de nitrato	154
4. Mejora genética de <i>Klebsiella oxytoca</i> CECT 4460 para favorecer la eliminación de altas cargas de nitrato	157
4.1. Construcción de plásmidos de amplio espectro de huésped, que portan el gen <i>nasB</i> de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	158
4.2. Introducción de la copia extra de <i>nasB</i> en el cromosoma de <i>K. oxytoca</i> CECT 4460.....	160
CONCLUSIONES	161
BIBLIOGRAFIA	165

ABREVIATURAS

- Ap: ampicilina.
CBR: contacto biológico rotatorio.
CECT: Colección Española de Cultivos Tipo.
CFU: unidad formadora de colonias.
Cm: cloranfenicol.
D: tasa de dilución.
D.O.₆₆₀: densidad óptica a 660 nm.
DOC: carbono orgánico disuelto.
ETG: etilenglicol.
IPTG: isopropil- β -D-tiogalactopiranosido.
Km: kanamicina.
LB: medio Luria-Bertani.
MATAB: bromuro de alquiltrimetilamonio.
 μ : tasa específica de crecimiento.
 μ_{\max} : tasa máxima de crecimiento.
Nal: nalidíxico.
NNEDA: ácido N-naftil-etilen-diamino.
pb: pares de bases.
 q_x : tasa de consumo específico.
rpm: revoluciones por minuto.
Sm: estreptomina.
SSV: sólidos volátiles en suspensión.
TCR: tiempo de retención celular.
UASB: "upflow activated sludge blanket".
UEE: Unión Española de Explosivos.
X-gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido.
 Y_x : tasa de rendimiento específico.

INTRODUCCION

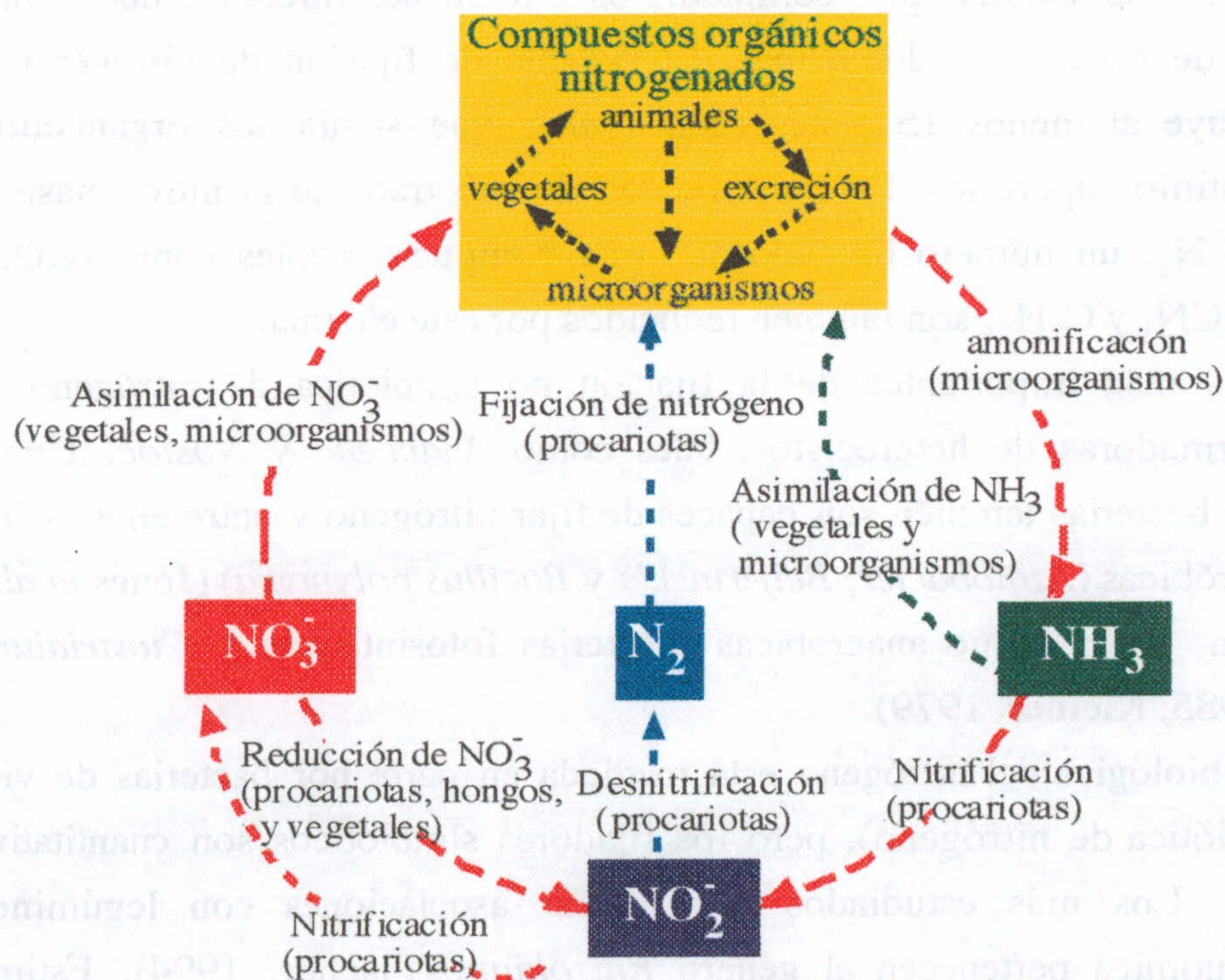


La vida en este planeta depende de la operación balanceada de los ciclos biogénicos del C, N, P, etc. El desarrollo industrial, agrícola y urbano en este último siglo ha perturbado los mismos y está dando lugar a la acumulación de una gran cantidad de productos que permanecen sobre la biosfera, siendo una fuente de contaminación. En este estudio nos hemos centrado en buscar soluciones biológicas a la alteración del ciclo del nitrógeno derivada de procesos industriales, como son la síntesis de explosivos.

1. CICLO DEL NITROGENO

El nitrógeno molecular (N_2) constituye alrededor del 80% de la atmósfera de la Tierra, pero a pesar de su abundancia es una forma químicamente inerte y por tanto no es una fuente de nitrógeno aprovechable por la mayor parte de los seres vivos, de hecho su utilización se restringe a un reducido grupo de organismos fijadores de N_2 (Merrick, 1992). Las plantas y animales, así como la mayoría de los microorganismos, dependen para su nutrición de formas de nitrógeno combinado o fijado. El nitrógeno combinado, en forma de amoníaco, nitrato y compuestos orgánicos, se considera con frecuencia que constituye el principal factor limitante para el crecimiento de los organismos vivos en muchos ecosistemas. Por esta razón la transformación cíclica de compuestos nitrogenados es de capital importancia para proveer las formas requeridas de nitrógeno a las distintas clases nutricionales de organismos que existen en la biosfera.

Figura 1. Ciclo del nitrógeno.



En el ciclo del nitrógeno se dan reacciones de oxidación de nitrógeno (nitrificación), reducción de nitrógeno (asimilación de NO_3^- , reducción de NO_3^- , desnitrificación y fijación de N_2), y reacciones sin cambio de valencia (amonicación y asimilación de NH_3) (Stanier *et al.*, 1991).

En la Figura 1 se esquematizan las características del ciclo del nitrógeno y estas se describen brevemente a continuación.

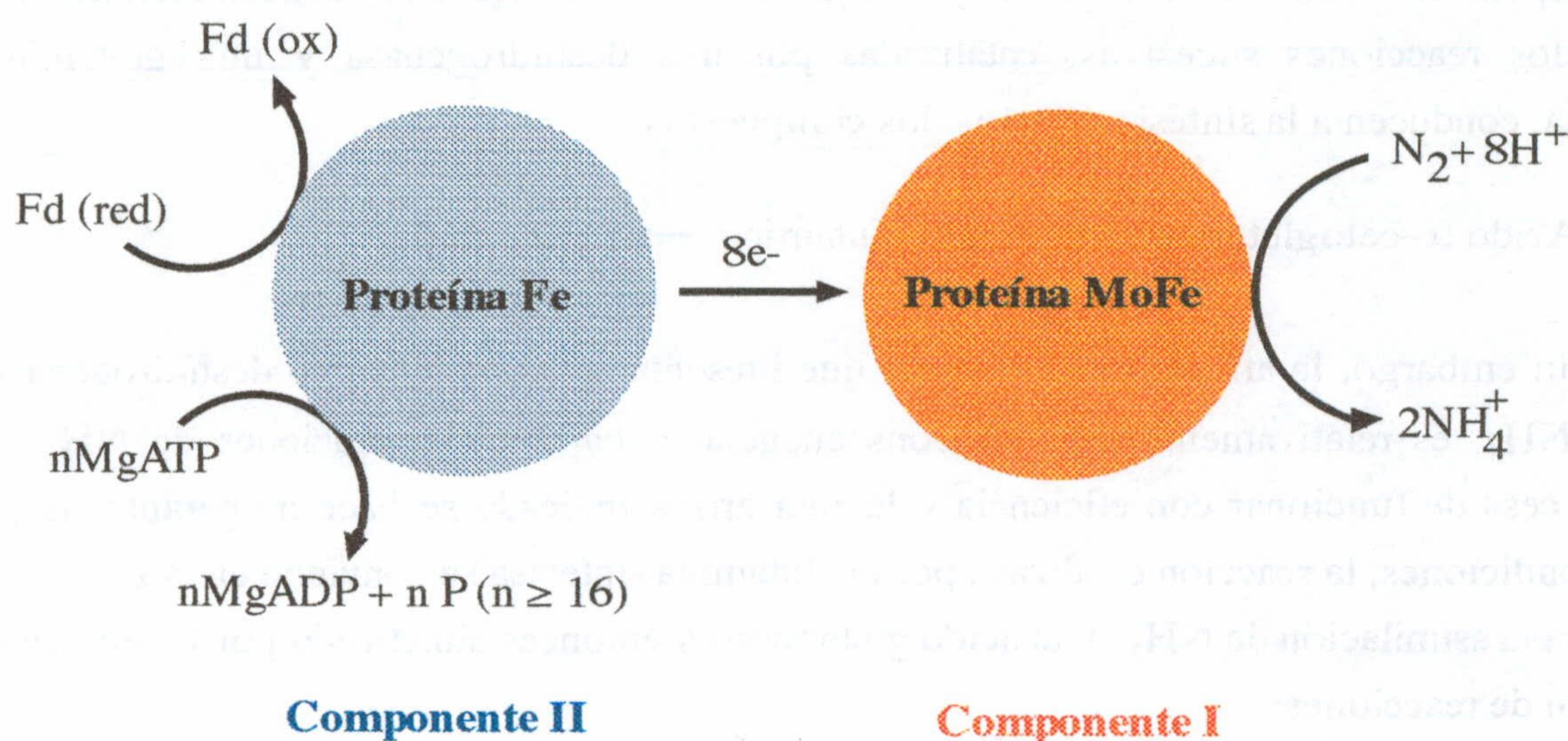
1.1 FIJACION DE NITROGENO

El recambio de nitrógeno a través de su ciclo se calcula que supone entre 10^8 y 10^9 toneladas al año. La enorme cantidad de nitrógeno gaseoso (N_2) que hay en la atmósfera, y la relativa escasez de nitrógeno combinado sobre la superficie de la Tierra sugieren que el proceso de fijación de nitrógeno es el paso limitante en su reciclaje. El proceso de fijación de nitrógeno es, en su mayor parte, biológico y las bacterias son los únicos organismos capaces de llevarlo a cabo.

El nitrógeno gaseoso (N_2) con valencia 0, debe ser reducido a amoníaco antes de su incorporación a componentes nitrogenados de las células. El sistema enzimático, denominado "complejo nitrogenasa" (Figura 2) se compone de dos proteínas llamadas nitrogenasa (o componente I, o ferromolibdoproteína) y reductasa de la nitrogenasa (o componente II, o ferroproteína). Los electrones se transfieren a través de un reductor de bajo potencial, ferredoxina o flavodoxina, hasta la reductasa de la nitrogenasa. Luego, paralelamente a la hidrólisis de al menos 16 moléculas de ATP, los electrones se transfieren a la nitrogenasa, donde ocurre la reducción de N_2 a NH_3 . El sitio activo en el que ocurre la reducción contiene un cofactor especial con molibdeno (MoFe). Aunque la estructura del cofactor Mo-Fe no se conoce por completo, es claramente diferente del cofactor de molibdeno (Mo) de otras molibdoenzimas. El sistema de fijación de nitrógeno es muy complejo, e incluye al menos 15 genes (genes *nif*), que según los organismos están dispuestos en distintos operones. La especificidad de sustrato de la nitrogenasa es muy baja, además del N_2 , un número limitado de otros compuestos tales como N_2O , HCN, CH_3CN , CH_2CHCN , y C_2H_2 , son también reducidos por este enzima.

Los agentes más importantes de la fijación no simbiótica de nitrógeno son las cianobacterias formadoras de heterocistos, tales como *Anabaena* y *Nostoc*. Una amplia variedad de otras bacterias también son capaces de fijar nitrógeno y entre ellas se incluyen tanto bacterias aeróbicas (*Azotobacter*, *Beijerinckia* y *Bacillus polymyxa*) (Jones *et al.*, 1984; Ramos y Robson, 1985) como anaeróbicas (bacterias fotosintéticas y *Clostridium* spp.) (Golden *et al.*, 1985; Kleiner, 1979).

La fijación biológica del nitrógeno está mediada en parte por bacterias de vida libre (fijación no simbiótica de nitrógeno), pero los fijadores simbióticos son cuantitativamente más importantes. Los más estudiados por formar asociaciones con leguminosas de importancia agronómica pertenecen al género *Rhizobium* (Fischer, 1994). Estimada en términos de nitrógeno fijado por hectárea de suelo y año, la contribución de las asociaciones leguminosa-*Rhizobium* es mucho mayor que la realizada por fijadores de nitrógeno no simbióticos.

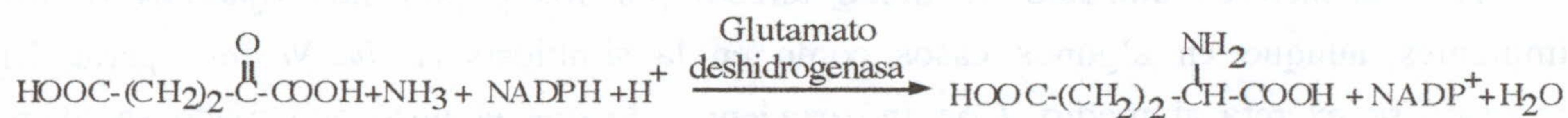
Figura 2. Estructura y función del complejo nitrogenasa.

El complejo nitrogenasa se compone de dos proteínas sensibles al oxígeno, la reductasa de la nitrogenasa (componente II), y la nitrogenasa (componente I). Los electrones son transferidos desde la ferredoxina reducida (Fd red) o en algunos casos flavodoxina, hasta un complejo magnesio-ATP (MgATP) de la reductasa de la nitrogenasa. Posteriormente se produce la hidrólisis de ATP, y los electrones son transferidos hasta la nitrogenasa, donde se produce la reducción de N_2 a NH_4^+ (Merrick, 1992).

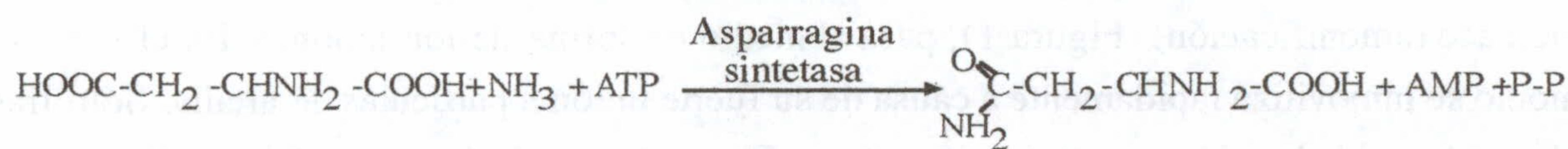
1.2. UTILIZACION DEL NITROGENO FIJADO

El producto inmediato de la fijación del nitrógeno, el amoníaco, es normalmente incorporado en glutamato, glutamina, y asparragina (Merrick y Edwards, 1995). Existen tres reacciones fundamentales de asimilación de NH_3 :

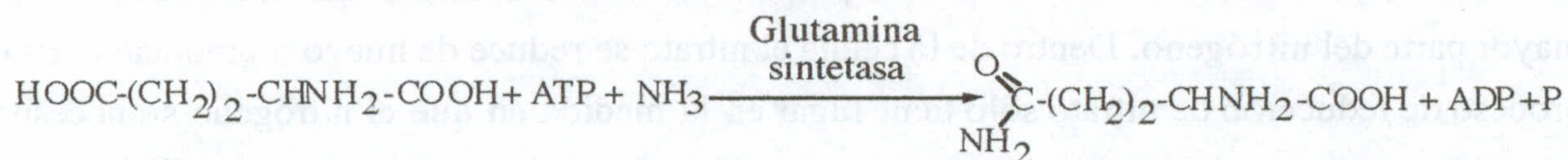
a) formación del grupo amino del ácido glutámico:



b) formación del grupo amino de la asparragina:

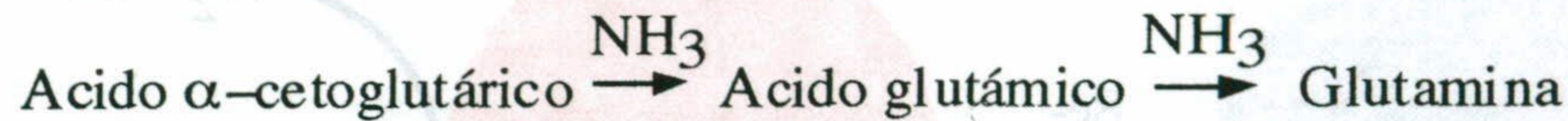


c) formación del grupo amino de la glutamina:

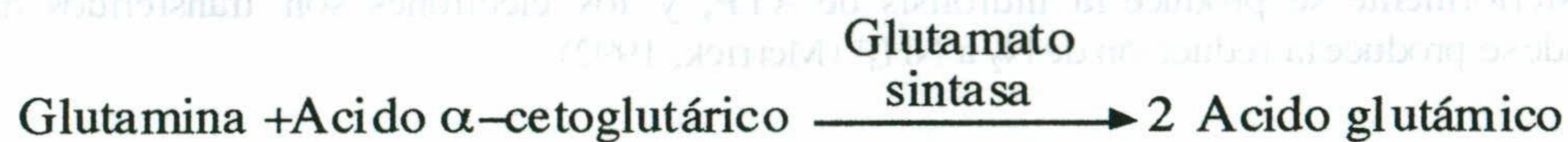
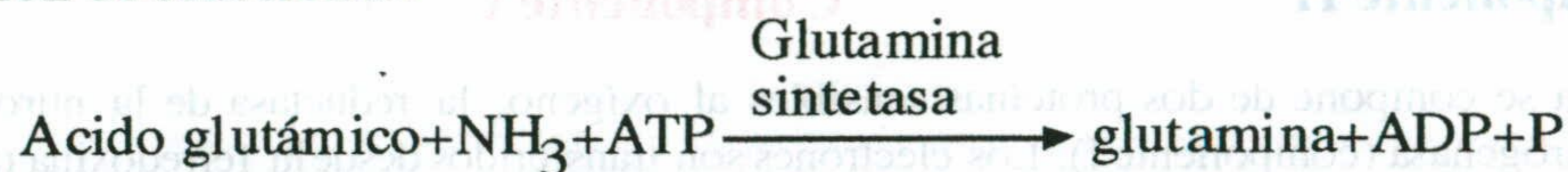


Los tres productos de la fijación de NH_3 son precursores directos de proteínas. Tanto el ácido glutámico como glutamina, pero no así asparragina, actúan como donadores de grupos amino y amido a todos los otros precursores nitrogenados de macromoléculas celulares.

Las rutas de síntesis de ácido glutámico y glutamina dependen de la concentración de NH_3 disponible en la célula (Merrick y Edwards, 1995). A elevadas concentraciones de NH_3 , dos reacciones sucesivas, catalizadas por una deshidrogenasa y una glutamina sintetasa, conducen a la síntesis de estos dos compuestos:



Sin embargo, la afinidad de substrato que presenta la α -cetoglutarico deshidrogenasa por el NH_3 , es relativamente baja; en consecuencia, a bajas concentraciones de NH_3 el enzima cesa de funcionar con eficiencia y la ruta arriba indicada se hace inoperante. Bajo estas condiciones, la reacción catalizada por la glutamina sintetasa se convierte en la principal ruta para la asimilación de NH_3 , y el ácido glutámico es entonces sintetizado por la siguiente sucesión de reacciones:



Dado que la ruta de la glutamina sintetasa-glutamato sintasa (GOGAT) sintetiza ácido glutámico utilizando ATP, la mayor parte de las bacterias presentan mecanismos reguladores que aseguran que este sistema solamente se utilice cuando la concentración disponible de amoníaco para la célula sea tan baja que la velocidad de crecimiento disminuyese si tuviera que ser asimilado tan sólo por la ruta de la glutamato deshidrogenasa.

El amoníaco es utilizado de modo directo por los organismos fijadores o sus simbiontes, aunque en algunos casos como en la simbiosis *Azolla-Nostoc*, parte del amoníaco se excreta al medio. Con independencia de que el nitrógeno fijado se libere directamente o tras haber pasado por tejidos vegetales o animales y reconvertirse en amoníaco (amonificación) (Figura 1), pasa al medio en forma de ión amonio. En el suelo el amonio se inmoviliza rápidamente a causa de su fuerte unión a partículas de arcilla. Sólo tras haber sido oxidado a ión nitrato (nitrificación) (Figura 1), el nitrógeno se difunde libremente en el suelo, y es en esta forma como las plantas y muchas bacterias del suelo asimilan la mayor parte del nitrógeno. Dentro de la célula el nitrato se reduce de nuevo a amoníaco. Este proceso de reducción de nitrato sólo tiene lugar en la medida en que el nitrógeno se necesita para el crecimiento; el amoníaco no se excreta. Esta característica, en particular, distingue la “asimilación de nitrato” por plantas y microorganismos de la “reducción de nitrato” (desnitrificación), un proceso de respiración anaeróbica que está sólo presente en procariotas (Figura 1).

1.3. TRANSFORMACIONES DE NITROGENO ORGANICO POR LAS CUALES SE FORMA AMONIACO

Los compuestos orgánicos sintetizados por las algas y las plantas sirven de fuente de nitrógeno para el reino animal. Durante su asimilación por los animales, los compuestos nitrogenados complejos de las plantas son hidrolizados en mayor o menor medida, pero el nitrógeno permanece esencialmente en forma orgánica reducida. A diferencia de los vegetales, sin embargo, los animales excretan una cantidad significativa de compuestos nitrogenados en el curso de su metabolismo. La forma en que es excretado este nitrógeno varía de un grupo de animales a otro, pudiendo hacerlo en forma de amoniaco, ácido úrico, o urea.

Solamente una parte del nitrógeno almacenado en compuestos orgánicos a través del crecimiento de la planta es convertido en amoniaco por el metabolismo animal y la descomposición microbiana del ácido úrico y urea. Gran parte de él permanece en la planta y en los tejidos animales y es liberado tras la muerte de los organismos. Entonces, parte del nitrógeno es asimilado por los propios microorganismos y es convertido en constituyente de las células microbianas. Finalmente, estos constituyentes son convertidos en amoniaco tras la muerte de los microorganismos.

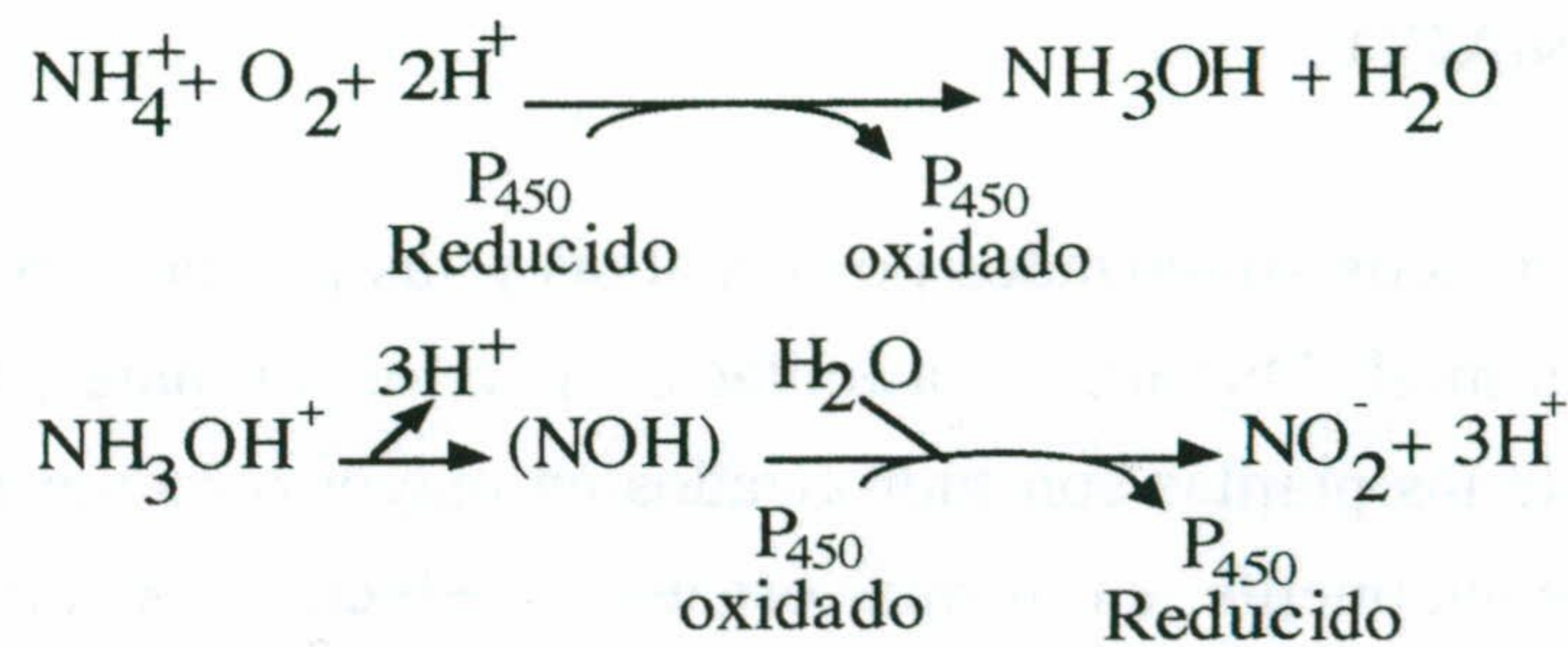
El primer paso de este proceso de amonificación es la hidrólisis de las proteínas y de los ácidos nucleicos, con liberación de aminoácidos y bases orgánicas nitrogenadas respectivamente. Estos compuestos más sencillos son posteriormente incorporados en el metabolismo celular por otros organismos.

1.4. NITRIFICACION

A lo largo de todas las transformaciones que sufre el nitrógeno desde el momento de su asimilación reductora por las plantas hasta su liberación como amoniaco, el átomo de nitrógeno permanece en la forma reducida. La conversión de amoniaco en nitrato (nitrificación) (Cole, 1994) es realizada en la naturaleza por grupos especializados de bacterias quimioautotróficas aerobias estrictas (Bock, 1991), y también se ha descrito en bacterias heterotróficas desnitrificantes (Castignetti y Hollocher, 1984). La nitrificación tiene lugar en dos pasos: un primer paso en el que el amoniaco es oxidado a nitrito, este paso lo realizan bacterias pertenecientes al género *Nitrosomonas*, *Nitrospira*, *Nitrosococcus* y *Nitrosolobus*; y, un segundo paso en el que el nitrito es oxidado a nitrato, este paso es realizado por bacterias pertenecientes a los géneros *Nitrobacter*, *Nitrospira*, y *Nitrococcus*.

La bioquímica de la oxidación del amoniaco y del nitrito se muestra en las siguientes reacciones:

(a)



(b)



El amoníaco es probablemente oxidado a hidroxilamina por una monooxigenasa, para la que el citocromo P₄₅₀ es el donador de electrones. El citocromo P₄₅₀ oxidado es posteriormente reducido cuando tiene lugar la oxidación de hidroxilamina a nitrito. De esta forma, dos de los electrones eliminados durante la oxidación de amoníaco a nitrito se pierden para el transporte de electrones en la generación de ATP porque son necesarios para reducir el citocromo P₄₅₀. En contraste con la complejidad de la oxidación de amoníaco, la oxidación de nitrito a nitrato es un proceso enzimáticamente sencillo.

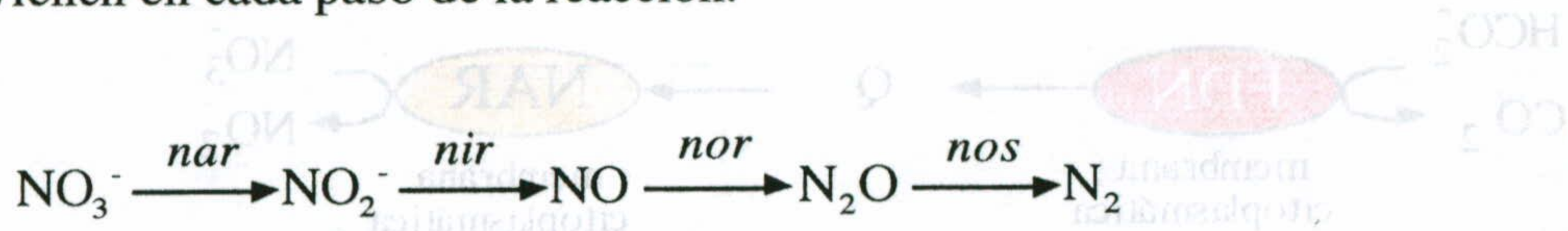
Por lo tanto, el nitrato es el principal material nitrogenado que existe disponible en el suelo para el crecimiento de los vegetales y microorganismos (Guerrero *et al.*, 1981).

Los nitratos son compuestos muy solubles, siendo fácilmente lixiviados del suelo y transportados por el agua; de ahí que una cierta cantidad de nitrógeno combinado esté siendo constantemente eliminada de los continentes y transportada hasta los océanos. Hoy en día, el nitrato es uno de los principales residuos procedentes de la actividad agrícola y de diversos tipos de actividades industriales, como la producción de compuestos nitroaromáticos, síntesis de compuestos nitroorgánicos, farmacéuticos, explosivos, fertilizantes, aguas residuales procedentes de industrias de uranio y la limpieza de tanques en industrias lácticas (Clarkson *et al.*, 1991; Francis y Makin, 1991; Kaplan *et al.*, 1987; Lawson, 1981; Pitt *et al.*, 1981; Smith *et al.*, 1994; Walker *et al.*, 1989).

1.5. DESNITRIFICACION

Algunas bacterias pueden utilizar nitrato en lugar de oxígeno como aceptor final de electrones en condiciones de anaerobiosis (Stewart, 1988; Zumft, 1992). La “respiración de nitrato” o desnitrificación es un proceso bacteriano que consiste en la reducción secuencial de óxidos de nitrógeno hasta rendir N₂. Las bacterias reducen nitrato a nitrito, y posteriormente ocurre una cascada de reacciones por las que el nitrito se reduce a óxidos de nitrógeno y

posteriormente a N_2 (Zumft, 1992). El siguiente esquema describe las sucesivas reacciones que tienen lugar, así como la terminología recomendada para el sistema de genes que intervienen en cada paso de la reacción:



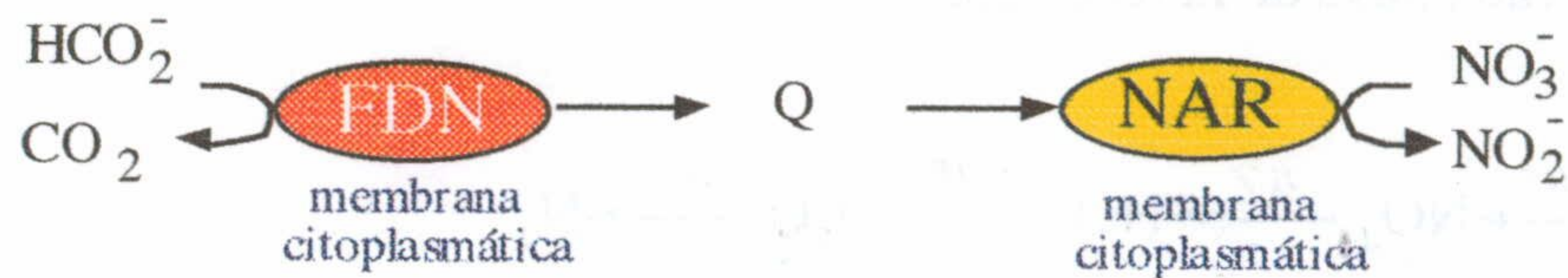
Las rutas existentes para la reducción anaeróbica de nitrato y nitrito en enterobacteriaceas se muestran en la Figura 3. La principal cadena respiratoria en *E. coli* consiste en una formato deshidrogenasa-N, una quinona y una nitrato reductasa, la cual está codificada por el operón *narGHJI* (Dubordieu y de Moss, 1992; Schröder *et al.*, 1992; Stewart, 1988). Este enzima contiene un cofactor con molibdeno, centros sulfo-férricos, y citocromo *b*. Muchas cepas de *E. coli* también sintetizan una cadena respiratoria formato-nitrito, la cual consiste en una formato deshidrogenasa-N, -H, o -O (Darwin *et al.*, 1993b) y una nitrito reductasa periplásmica (citocromo c_{552}), codificada por el operón *nrfABCDEFG* (Darwin *et al.*, 1993a). Una ruta alternativa en la reducción anaeróbica de nitrito es la que implica una nitrito reductasa dependiente de NADH, de localización citoplasmática (Coleman *et al.*, 1978), que está codificada por el operón *nirBD* (Figura 3) (Harborne *et al.*, 1992). La reducción de nitrito por esta enzima no está acoplada a la generación de fuerza protón motriz, por lo tanto no constituye una ruta respiratoria (Pope y Cole, 1982). Diversos ensayos sugieren que la nitrito reductasa dependiente de NADH juega un papel importante en la detoxificación del nitrito acumulado en el medio por las células que respiran nitrato, y como una vía de regeneración de NAD^+ (Page *et al.*, 1990).

1.5.1. Regulación de la síntesis de nitrato reductasa y nitrito reductasa respiratorias

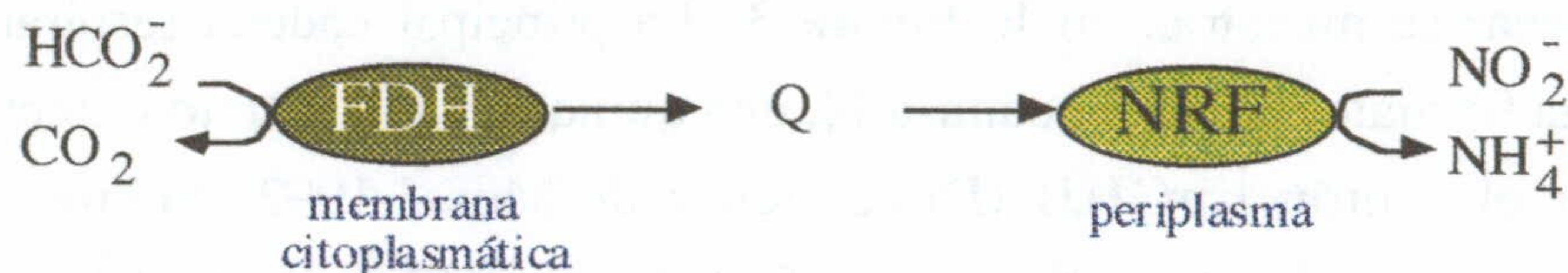
La síntesis de las enzimas respiratorias es independiente de la disponibilidad de amonio en el medio. Su síntesis se encuentra inducida en condiciones anaeróbicas a través de la proteína FNR, y por la presencia de nitrato o nitrito a través de las proteínas reguladoras NARL y NARP, las cuales forman parte de un sistema regulador de dos componentes (Schröder *et al.*, 1992; Stewart, 1993). Las proteínas sensoras NARX y NARQ, detectan la disponibilidad de nitrato y nitrito, y controlan la actividad de las proteínas reguladoras NARL y NARP (Chiang *et al.*, 1992; Darwin y Stewart, 1996; Kaiser y Sawers, 1995; Schröder *et al.*, 1994). Adicionalmente, el nitrato reprime la síntesis de la nitrito reductasa respiratoria, y este control se encuentra mediado por la proteína NARL.

Figura 3 . Rutas para la reducción anaeróbica de nitrato y nitrito en enterobacterias

Respiración de nitrato



Respiración de nitrito



Desasimilación de nitrito



Q, ubiquinona/ubiquinol; FDN, formato deshidrogenasa-N; NAR, nitrato reductasa respiratoria; FDH, formato deshidrogenasa-N,-H o -O; NRF, nitrito reductasa respiratoria; NIR, nitrito reductasa desasimilatoria (Stewart, 1994).

1.5.2. Importancia ecológica de la desnitrificación

La desnitrificación es un proceso de enorme importancia ecológica, ya que agota los nutrientes esenciales para los vegetales. La cantidad de nitrógeno fijado de los abonos que se pierde a través de la desnitrificación puede acercarse al 80%. Sin embargo, no todas las consecuencias de la desnitrificación son negativas, la desnitrificación es esencial para la continuada disponibilidad de nitrógeno combinado en los continentes. El nitrato es constantemente lixiviado del suelo y es arrastrado a los océanos. Sin la desnitrificación, el aporte de nitrógeno a la Tierra, incluido el N_2 de la atmósfera, se acumularía en los océanos.

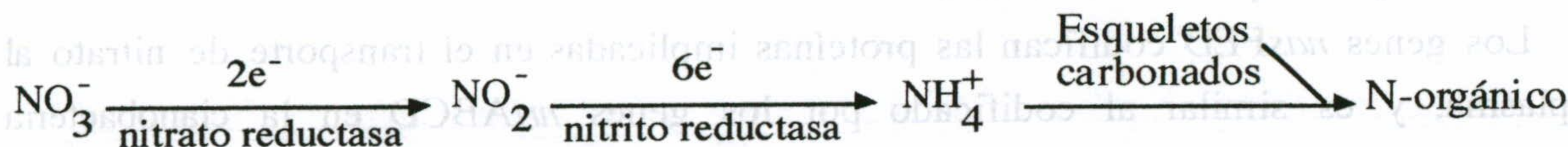
La desnitrificación mantiene también la potabilidad de las aguas dulces, ya que concentraciones de nitrato elevadas pueden resultar tóxicas. Es por ello que este proceso es el clásicamente utilizado para la depuración de aguas ricas en compuestos nitrogenados. La desnitrificación es un proceso que se da en más de 50 géneros bacterianos, no obstante las bacterias responsables del proceso de desnitrificación, son mayoritariamente *Alcaligenes* (Kakutani *et al.*, 1981), *Paracoccus denitrificans*, *Pseudomonas* spp. (Cuypers y Zumft, 1992), *Achromobacter* y *Bacillus* (Smith *et al.*, 1972) y bacterias del género *Moraxella* y *Acinetobacter* (Knowles, 1982). La adición de metanol en este tipo de procesos suele resultar en el enriquecimiento en microorganismos desnitrificantes como *Hyphomicrobium*

spp. (Nurse, 1980), y diferentes consorcios entre bacterias consumidoras de metanol y productoras de otra fuente de carbono, como citrato e isocitrato, el cual soporta el crecimiento de bacterias desnitrificantes. La presencia de consorcios ha demostrado ser esencial en el tratamiento de este tipo de residuos (Rhee y Fush, 1978).

1.6. ASIMILACION DE NITRATO POR LOS MICROORGANISMOS

El nitrato es la forma más abundante de nitrógeno en la biosfera después del nitrógeno atmosférico, y es la forma más ampliamente utilizada por los organismos, incluyendo plantas superiores, algas, hongos y bacterias para la asimilación de nitrógeno (Guerrero *et al.*, 1981; Stewart, 1988).

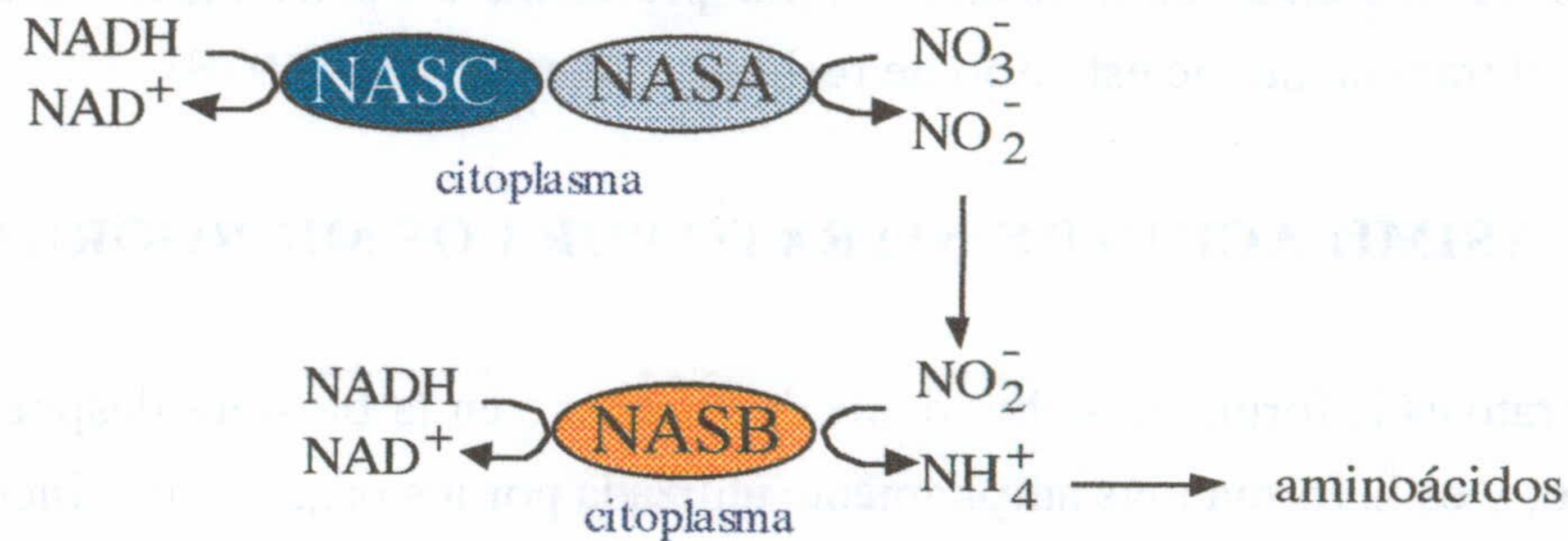
El nitrato puede ser utilizado como una fuente asimilable de nitrógeno por un gran número de microorganismos mediante la ruta asimilatoria de nitrato, la cual incluye la reducción de NO_3^- a NO_2^- con la utilización de 2 electrones en una reacción mediada por la nitrato reductasa asimilatoria, y una posterior reducción de NO_2^- a NH_4^+ en una reacción que incluye 6 electrones mediada por la nitrito reductasa asimilatoria (Guerrero *et al.*, 1981). Posteriormente, el NH_4^+ es incorporado al metabolismo central de las bacterias mediante una de las dos rutas descritas en el apartado 1.2, la glutamato deshidrogenasa o la glutamina sintetasa/glutamato sintasa. La ruta se esquematiza de la siguiente forma:



Algunos aerobios estrictos pueden usar nitrato como única fuente de nitrógeno tras su reducción asimilatoria (Ogawa *et al.*, 1995; Nakano *et al.*, 1995). Algunas bacterias, como *Klebsiella* spp, y *Pseudomonas aeruginosa*, son capaces de llevar a cabo ambas rutas de utilización de nitrato (respiratoria y asimilatoria) (Riet *et al.*, 1968; Bender y Friedrich, 1990; Cali *et al.*, 1989).

1.6.1. Asimilación de nitrato en enterobacterias

En *Klebsiella* spp. la nitrato reductasa asimilatoria consta de dos subunidades, una subunidad mayor catalítica que contiene como cofactor molibdeno, y una subunidad menor que interviene en la transferencia de electrones a partir del NADH (Figura 4) (Lin *et al.*, 1993). Estas proteínas se encuentran codificadas por los genes *nasA* y *nasC* respectivamente. La nitrito reductasa asimilatoria, codificada por el gen *nasB* (Figura 4), es muy similar a la nitrito reductasa dependiente de NADH de *E. coli* y de hongos filamentosos (Lin *et al.*, 1993; Lin *et al.*, 1994).

Figura 4. Ruta para la asimilación de nitrato y nitrito en enterobacterias.**Asimilación de nitrato**

NASA and NASC, nitrato reductasa asimilatoria; NASB, nitrito reductasa asimilatoria (Stewart, 1994).

1.6.1.1. Genes estructurales del operón *nas*

Estudios genéticos con *Klebsiella* spp. han identificado el operón *nasFEDCBA* como el implicado en la codificación de las proteínas estructurales y reguladoras involucradas en la asimilación de nitrato (Figura 5), (Cali *et al.*, 1989; Lin *et al.*, 1993; Lin *et al.*, 1994). Este operón está localizado inmediatamente adyacente al grupo de genes *nar* (respiración de nitrato). Este hecho fue sorprendente, dada la total independencia fisiológica y genética entre la asimilación y la respiración de nitrato.

Los genes *nasFED* codifican las proteínas implicadas en el transporte de nitrato al citoplasma, y es similar al codificado por los genes *nrtABCD* en la cianobacteria *Synechococcus* sp. (Omata *et al.*, 1993). Se ha demostrado que el transporte de nitrato en *K. pneumoniae* es dependiente de energía (Thayer y Huffaker, 1982), pero su mecanismo específico no se conoce en detalle. Tanto los genes *nasFED* como los genes *nrtABCD* son necesarios para la asimilación de nitrato y no de nitrito, sugiriendo que existe una ruta alternativa para la entrada de nitrito (Omata *et al.*, 1994; Lin *et al.*, 1994), de hecho parte del nitrito puede entrar en forma ácida como HNO_2 . El gen *nasB* codifica una nitrito reductasa dependiente de NADH que es homóloga a todas las enzimas de este tipo caracterizadas en plantas, hongos y bacterias (Lin *et al.*, 1993). El gen *nasA* codifica una proteína con un cofactor molibdeno en el dominio amino-terminal, similar al de las molibdoenzimas procarióticas, y en la región carboxilo-terminal tiene un grupo 4Fe-4S (Lin *et al.*, 1993). El gen *nasC* codifica una proteína parecida a la subunidad reductora de NADH de una gran variedad de reductasas. Estudios de complementación muestran que ambas, *nasA* y *nasC* son necesarias para la asimilación de nitrato (Lin *et al.*, 1994). Esto sugiere que la nitrato reductasa contiene al menos dos subunidades, una, NASC que interviene en el flujo de

electrones a partir del NADH; y otra, NASA, la cual contiene la subunidad catalítica para la reducción de nitrato.

1.6.1.2. Regulación de la síntesis de nitrato reductasa y nitrito reductasa asimilatorias

Las enzimas y genes estructurales para la respiración y asimilación de nitrato/nitrito son distintas, y están sujetas a diferentes mecanismos de regulación (Stewart, 1994). La síntesis de las enzimas asimilatorias es independiente de la disponibilidad de oxígeno. Su síntesis se encuentra inducida por la limitación de amonio a través de la proteína NTRC (Bender y Friedrich, 1990; Cali *et al.*, 1989; North *et al.*, 1993), y por la presencia de nitrato o nitrito a través de la proteína NASR (Goldman *et al.*, 1994), la cual actúa como un antiterminador de la transcripción. La inducción de nitrato y nitrito no requiere la proteína NARL (Stewart y Cali, 1990; Goldman *et al.*, 1994). A pesar de que el sistema enzimático respiratorio y asimilatorio de nitrato son genéticamente distintos y sujetos a diferentes formas de regulación, los genes estructurales y reguladores se encuentran íntimamente ligados en el cromosoma de *Klebsiella* sp. (Figura 5).

Figura 5. Organización de los genes *nas* (asimilación de nitrato) y *nar* (respiración de nitrato) en *Klebsiella pneumoniae* M5al.



nasR, activador de la transcripción del operón *nasF*; *nasFEDCBA*, codifica las proteínas implicadas en el transporte de nitrato y en la reducción de nitrato y nitrito; *narLX*, sensor y regulador para la regulación por nitrato de la síntesis de las enzimas respiratorias; *narK*, nitrato permeasa; *narGHJI*, nitrato reductasa respiratoria (Stewart, 1994)

1.6.1.2.1. La proteína NASR

El gen *nasR* está localizado inmediatamente aguas arriba del operón *nasFEDCBA*, y se transcribe en la misma dirección (Goldman *et al.*, 1994). Análisis genéticos determinaron que inserciones en el gen *nasR* eliminaban la inducción por nitrato/nitrito (Goldman *et al.*, 1994), siendo los mutantes incapaces de asimilar nitrato/nitrito. La proteína NASR es un activador de la transcripción del operón *nasFEDCBA* que responde a nitrato/nitrito. La

secuencia de esta proteína comparte importantes similitudes con la región carboxilo-terminal de la proteína AMIR de *Pseudomonas aeruginosa*, un regulador positivo de la expresión del gen *amiE* (amidasa) (Drew y Lowe, 1989; Lowe *et al.*, 1989; Goldman *et al.*, 1994). La proteína AMIR actúa como un antiterminador de la transcripción, sugiriendo un papel similar para la proteína NASR para el control de la expresión del operón *nasFEDCBA*.

1.6.1.2.2. La región reguladora del operón *nasFEDCBA*

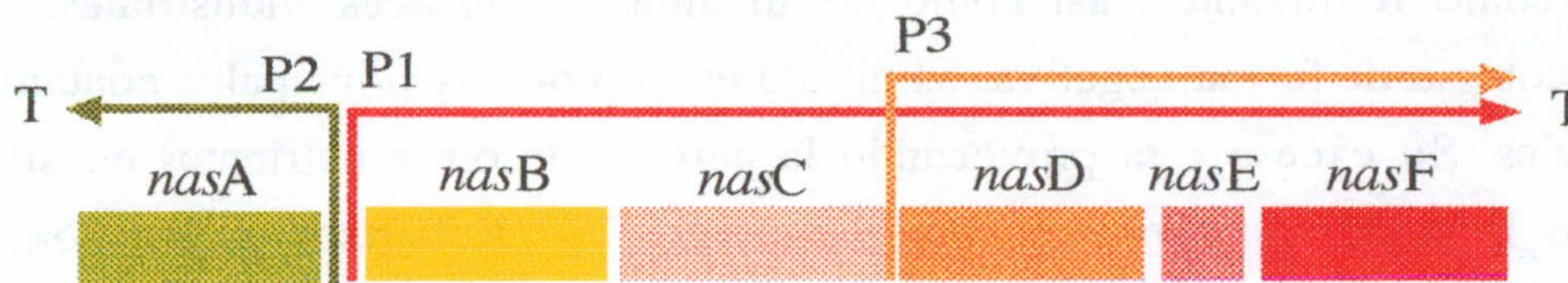
Análisis de secuencias de ADN han identificado características regulatorias dependientes de NTRC en el operón *nasFEDCBA* aguas arriba de la región reguladora (Lin y Stewart, 1996). Alrededor de 160 pb aguas arriba del codón de iniciación de *nasF*, existe una secuencia promotora consenso -12/-24 dependiente de la iniciación de la transcripción por σ^{54} . Aguas arriba del presunto promotor, existen secuencias en tandem compartiendo similitudes con la secuencia consenso de unión de la proteína NTRC (North *et al.*, 1993). Análisis de deleciones, confirmaron la importancia de estas secuencias aguas arriba como mediadoras de la expresión del operón *nasFEDCBA* en respuesta a limitación de nitrógeno (Lin y Stewart, 1996). El operón *nasFEDCBA* tiene la peculiaridad de estar sujeto a un segundo nivel de regulación transcripcional, la inducción por nitrato/nitrito. Aparéentemente, la inducción por nitrato/nitrito actúa a través de un sistema antiterminador de la transcripción. Análisis de la región líder de 160 pb del operón *nasFEDCBA* revelan la presencia de una estructura terminadora independiente de la transcripción, una región rica en GC que se encuentra inmediatamente seguida de una cola de residuos T. Análisis de deleción dan una idea consistente de que la función terminadora en ausencia de nitrato/nitrito, previene una alta expresión del operón *nasFEDCBA*, y que la terminación se ve atenuada por la presencia de nitrato o nitrito (Lin y Stewart, 1996). Se supone que esa atenuación en la terminación se encuentra mediada por la proteína NASR, por lo tanto la regulación por nitrato/nitrito parece no jugar un papel de control en el inicio de la transcripción, sino un control de la terminación de la transcripción en la región líder.

1.6.2. Asimilación de nitrato en bacterias gram-positivas

Algunas bacterias gram positivas, como *Bacillus subtilis*, pueden usar una amplia gama de compuestos como fuentes de nitrógeno (Fisher, 1993), incluyendo nitrato. Se conoce poco acerca de la bioquímica y de la genética de la asimilación de nitrato en este grupo de bacterias, no obstante, en los últimos años se han hecho esfuerzos en este sentido por varios grupos de investigación. Ogawa *et al.*, 1995, han aislado y analizado una secuencia de ADN que contiene seis genes (*nasA*, *nasB*, *nasC*, *nasD*, *nasE*, *nasF*) necesarios para la asimilación de nitrato y nitrito en *Bacillus subtilis*. La transcripción de los

genes *nasB* a *nasF*, que forman el operón *nasBF*, se produce en la misma dirección a partir del promotor P1, y el gen *nasA* se transcribe divergentemente a partir del promotor P2 (Nakano *et al.*, 1995) (Figura 6). También existen evidencias de la existencia de un promotor interno (P3) delante de *nasD*. Se han detectado dos secuencia terminadoras de la transcripción, una inmediatamente detrás de *nasF*, y la otra 150 pb aguas abajo de *nasA* (Figura 6).

Figura 6 . Esquema de la organización del operón *nasB* y del gen *nasA*.



Las cajas representan secuencias de lectura abierta que codifican NasA, -B, -C, -D, -E, y -F. Se muestra la localización de los promotores (P) y de los terminadores de la transcripción (T). Las flechas representan la dirección y longitud de las unidades de transcripción (Ogawa *et al.*, 1995).

Se ha comparado la estructura de las proteínas codificadas por estos genes con otras existentes en bancos de datos y se ha elucidado la posible función ejercida por las mismas. Esta información se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1 . Secuencias de homología de los genes *nasA* a *nasF* (Ogawa *et al.*, 1995).

Gen	Función probable del producto	Homología (% identidad)
<i>nasA</i>	transporte de NO_3^-	NarK (24%) de <i>E. coli</i>
<i>nasB</i>	subunidad transferidora de electrones de la nitrato reductasa	NirB (30%) de <i>E. coli</i> ; NasB (27%) de <i>K. pneumoniae</i> (27%); NiiA (27%) de <i>A. nidulans</i>
<i>nasC</i>	subunidad catalítica de la nitrato reductasa	NarB (31%) de <i>Synechococcus</i> sp., FdhF (28%) de <i>E. coli</i>
<i>nasD</i>	subunidad de la nitrito reductasa	NirB (33%) de <i>E. coli</i> , NasB (33%) de <i>K. pneumoniae</i> ; NiiA (33%) de <i>A. nidulans</i>
<i>nasE</i>	subunidad de la nitrito reductasa	NirD (30%) de <i>E. coli</i>
<i>nasF</i>	S-adenosil-L-metionina:uroporfirinógeno III metiltransferasa	CysG (40%) de <i>E. coli</i> , CobA (39%) de <i>P. denitrificans</i> , CobA (52%) de <i>B. megaterium</i>

2. EFECTOS TOXICOS DEL NITRATO Y NITRITO

A pesar de la amplia distribución de organismos capaces de utilizar nitrato y la gran variedad de ambientes donde este compuesto sirve para múltiples propósitos, esta forma inorgánica de nitrógeno es un contaminante, y su eliminación es una prioridad para un gran número de agencias de protección medioambiental (Council of the European Community, 1991; Sayre, 1988; Tanaka y Emori, 1993).

Debido a la alteración del ciclo natural del nitrógeno por el uso abusivo de compuestos nitrogenados como fertilizantes, así como las distintas actividades industriales, se está alterando la ecología de forma negativa. El nitrato es uno de los principales contaminantes medioambientales. Su exceso está provocando la pérdida de otros nutrientes en suelos, e incrementando la acidez de suelos y aguas superficiales (Robertson y Kuenen, 1992; Crutzen y Andreae, 1990). El nitrato, junto con el fósforo, es el responsable de la eutrofización de aguas continentales y marinas (Robertson y Kuenen, 1992; Zevemboom *et al.*, 1990; Abeliovitch, 1993). También es el responsable del incremento de compuestos nitrogenados, tales como los óxidos nítrico y nitroso, que polucionan la atmósfera (Crutzen, 1970; Crutzen, 1976). El óxido nitroso es uno de los causantes del efecto invernadero y tiene una vida media larga (McElroy *et al.*, 1977, Liu *et al.*, 1977; Wang *et al.*, 1976; Rasmussen y Khalil, 1986; Cole, 1993) y el óxido nítrico contribuye a la formación de humo, niebla, y lluvia ácida, la cual causa corrosión y degradación de edificios y monumentos (Baumgarter *et al.*, 1991).

El nitrato, junto con SO_2 , y SO_4^{2-} , es considerado un polucionante antropógeno. En adultos no se ha provado aún que el nitrato sea peligroso para la salud, pero existen indicios de su relación epidemiológica con la aparición de cáncer de pulmón (Cislaghi y Nimis, 1997), y parece estar asociado con un aumento en el riesgo de contraer determinados tipos de linfomas (Cancer Net News, National cancer Institute, 1996, Scientific American, 1996). El mecanismo por el cual el nitrato causa cáncer en humanos no se ha establecido aún, pero se sabe que el nitrato presente en el agua puede combinarse en el interior del cuerpo humano con otros compuestos químicos que contienen nitrógeno, formando agentes causantes del cancer conocidos como agentes carcinogénicos N-nitrosos (Kross *et al.*, 1993; Brunning y Kaneene, 1993). Por el contrario, su efecto tóxico ha sido ampliamente descrito en niños, en los cuales es el causante de la methemoglobinemia, o el "síndrome del niño azul" (Mateju *et al.*, 1992; Hiskock *et al.*, 1991).

En cuanto al efecto tóxico del nitrato sobre los microorganismos, se sabe que a concentraciones altas el nitrato es un agente caotrófico, y se ha establecido su capacidad de extraer proteínas de las membranas celulares (Manzano *et al.*, 1976). Su presencia a concentraciones relativamente bajas normalmente no limita su transporte, ya que la mayoría de los organismos tienen sistemas activos para el transporte de nitrato (Flores *et al.*, 1983; Fossing *et al.*, 1996; Lin *et al.*, 1994, Rai *et al.*, 1981). Normalmente, las comunidades

microbianas son capaces de hacer frente a bajas concentraciones de nitrato ($<50 \text{ mg L}^{-1}$), similar al encontrado en ambientes naturales (Fossing *et al.*, 1996), en plantas de tratamiento biológico. No obstante, cuando las plantas de tratamiento biológico reciben altas cargas de nitrato procedentes de descargas industriales, el crecimiento celular se inhibe por la reducción futil de nitrato a nitrito (Krishnamachari y Clarkson, 1993), causando un colapso en la operación de plantas de tratamiento urbano (Hiscock *et al.*, 1991). La acumulación de nitrito durante la reducción biológica de nitrato es muy variable y depende no solo del microorganismo (Carlson e Ingraham, 1983), sino también de las condiciones de crecimiento (Beccari *et al.*, 1983; Betlach y Tiedje, 1981; Blaszyk, 1993; Wilderer *et al.*, 1987). El nitrito es un compuesto tóxico para muchos organismos, y es uno de los causantes de la inhibición de la desnitrificación (Beccari *et al.*, 1983; Almeida *et al.*, 1995a, 1995b), y del crecimiento (Lewanoski y Baltzis, 1992), siendo un agente mutagénico en su forma ácida HNO_2 (Hirose *et al.*, 1982). Una gran variedad de efectos se han relacionado con el efecto tóxico del nitrito sobre los microorganismos:

a) El aumento en la conductividad a protones en la membrana citoplasmática de *Paracoccus denitrificans* (Meijer *et al.*, 1979), y en *Pseudomonas fluorescens* (Sijbesma *et al.*, 1996), actuando pues como un protonóforo.

b) La inhibición de la cadena transportadora de electrones en el sistema respiratorio de membrana, sin desacoplamiento, lo cual se ha observado en *Paracoccus denitrificans* y en dos especies de *Pseudomonas* (Rake y Eagon, 1980).

c) La inhibición de la respiración aeróbica por interacción con la parte terminal de la cadena respiratoria (Kucera *et al.*, 1983).

d) La inhibición de los enzimas glicolíticos por reacción con grupos tiol (O'leary y Solberg, 1976), y de determinados enzimas metabólicos (Yarbrough *et al.*, 1980).

e) La inhibición del transporte activo dependiente de protones, del consumo de O_2 , y de la fosforilación oxidativa en *Pseudomonas aeruginosa* (Yarbrough *et al.*, 1980).

3. TRATAMIENTOS PARA LA ELIMINACION DE NITROGENO EN AGUAS RESIDUALES

Existe un gran número de industrias que generan aguas residuales ricas en compuestos nitrogenados (N-orgánico, NH_4^+ , NO_3^- , NO_2^-). En la Tabla 2 se relacionan una serie de industrias en las cuales sus vertidos contienen N. La composición y las características de las aguas residuales industriales que contienen este tipo de compuestos son muy diversas, por lo que la utilización de plantas convencionales de aguas urbanas, modificadas para la eliminación biológica de nitrógeno, presenta dificultades, y los resultados obtenidos no son siempre satisfactorios.

Aunque existen distintas alternativas para la eliminación de compuestos nitrogenados, la más ampliamente utilizada es la eliminación biológica mediante un proceso acoplado de

nitrificación-desnitrificación, los cuales pueden ser combinados (en una sola fase) o separados (en dos fases). El diseño de los sistemas de nitrificación-desnitrificación en una o dos fases, depende del contenido particulado del influente rico en NO_3^- . Para residuos con un alto contenido particulado, es apropiado el uso de un reactor agitado en anaerobiosis. Por el contrario, si el contenido particulado es relativamente bajo, se pueden utilizar varios tipos de reactores del tipo de "lecho empaquetado". El material de empaquetamiento utilizado en este tipo de reactores puede ser arena o grava. También se pueden utilizar materiales más ligeros como carbón, que junto con tasas de flujo mayores dan lugar a reactores del tipo de "lecho fluido", en los cuales el material de empaquetamiento se encuentra en suspensión.

El diseño de nuevas unidades capaces de eliminar los compuestos de nitrógeno mediante procesos biológicos se ha orientado en una primera fase a la adaptación y rediseño de las instalaciones convencionales de tratamiento de aguas residuales urbanas, existiendo múltiples procesos comerciales que se están utilizando ya de forma convencional.

Tabla 2. Fuentes de contaminación de compuestos nitrogenados

Fuente	N-orgánico	NH_4^+	NO_3^-	NO_2^-
Agricultura intensiva	-	+	+	+
Instalaciones ganaderas	+	+	-	-
Industria cárnica y mataderos	+	+	-	-
Embutidos	-	-	-	+
Industria láctea	+	-	+	-
Industria conservera	+	-	-	-
Industria alimentaria	-	+	-	-
Industrias de fermentación	+	+	+	-
Destilerías	+	+	+	-
Fabricación de explosivos	+	-	+	-
Instalaciones nucleares	-	-	+	-
Astilleros	-	-	+	+
Industria metalúrgica	-	-	+	-
Fabricación de plásticos	+	+	+	-
Industria textil	+	-	-	-
Industria petrolífera	+	-	-	-
Industria automovilística	+	-	-	-
Industria farmacéutica	-	-	+	-
Tenerías	-	-	+	-
Manufactura de fertilizantes	+	+	+	-

3.1. SISTEMAS COMBINADOS DE NITRIFICACION-DESNITRIFICACION

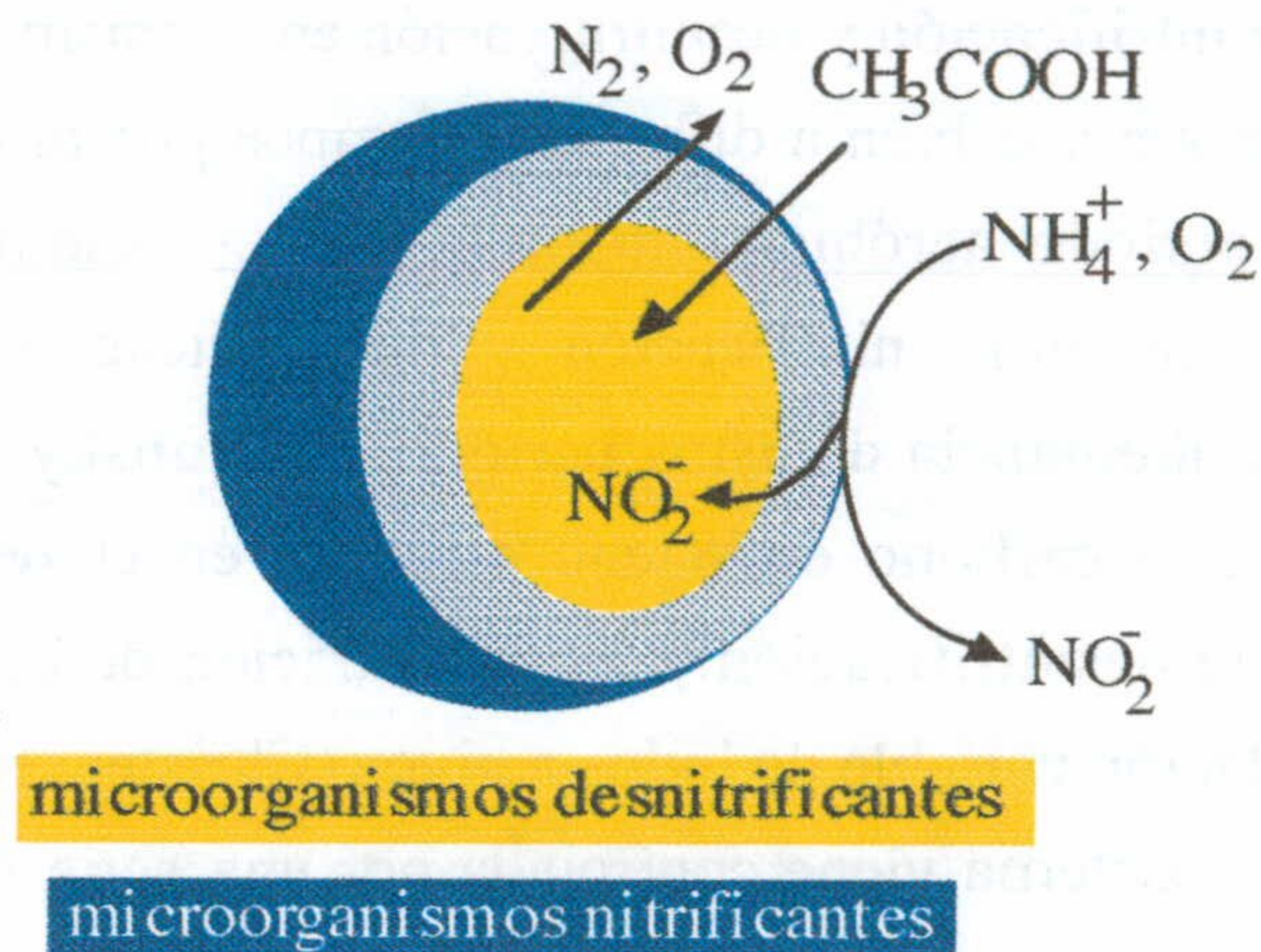
En los tratamientos a gran escala de aguas municipales u otro tipo de residuos, se utilizan diferentes procesos, bien con cultivos suspendidos, formando biopelículas (biofilms), o una combinación de ambos (Christensen y Harremoës, 1978). Un ejemplo de cultivos suspendidos son los reactores con agitación de lodos activos (o activados). Las condiciones para favorecer nitrificación y desnitrificación en el mismo reactor se pueden dar en distintas regiones del mismo, o bien a diferentes tiempos por aireación intermitente. La nitrificación ocurre en el periodo aeróbico, mientras que la desnitrificación ocurre en el periodo anaeróbico. La razón entre nitrificación y desnitrificación está regulada por la frecuencia y duración de la alternancia de estos periodos (Goronsky *et al.*, 1996). Este tipo de plantas opera utilizando el carbono endógeno existente en el residuo como fuente de carbono para llevar a cabo la desnitrificación. La concentración de biomasa es mantenida en el reactor mediante recirculación variable de lodos activos (Christensen y Harremoës, 1978). La actividad de este tipo de sistema viene controlada por una serie de parámetros como la temperatura, la razón C/N del influente (y su contenido en nitrógeno orgánico e inorgánico), y la razón entre el tiempo de retención en la fase aerobia y en la fase anaerobia. Este último factor es muy importante para el buen funcionamiento de las dos fases del tratamiento, nitrificación y desnitrificación, y el mantenimiento de las respectivas poblaciones bacterianas. El total de nitrógeno eliminado con este sistema oscila entre el 60% y el 80%.

Otro proceso que utiliza lodos activos, es el sistema "Carrousel" o canal de oxidación, que depende de la recirculación del agua a través de canales incorporando zonas aeróbicas y anaeróbicas (Ritman y Langeland, 1985; van der Geest y Witvoet, 1985). Las zonas anóxicas se logran por la limitación de la aireación, un consumo de oxígeno suficientemente alto, y suficiente distancia entre los rotores de aireación. Alternativamente, se suministra aireación intermitente en pequeños canales de oxidación para provocar las condiciones óptimas para la nitrificación y desnitrificación (Araki *et al.*, 1979).

Otro sistema integrado de nitrificación-desnitrificación, muy diferente e innovador, fue propuesto por Tramper (1984, 1987). Tramper y colaboradores investigaron la posibilidad de usar geles de inmovilización que contienen una capa externa nitrificante que envuelve a una capa interna desnitrificante en un único sistema biocatalizador (Figura 7). En este sistema se establecen zonas aeróbicas y anóxicas dentro del propio soporte, como resultado de la limitación en la difusión de oxígeno a la capa interna, debido al consumo de oxígeno por los organismos nitrificantes de la capa externa (Martins dos Santos *et al.*, 1992, 1993, 1996). En sus investigaciones utilizan reactores de corriente de aire ("air-lift"), donde se introducen las partículas de gel conteniendo las células inmovilizadas. De este modo, las aguas residuales pueden ser tratadas sin la necesidad de recirculación a partir de ningún otro reactor o compartimento anóxico. Este proceso ha sido utilizado a escala de laboratorio

utilizando células de *Nitrosomonas europea* y *Pseudomonas spp.* coinmovilizadas en carragenato (Martins dos Santos *et al.*, 1996a,b).

Figura 7 . Esquema del sistema integrado nitrificante-desnitrificante diseñado por Tramper y colaboradores.



Capa externa: nitrificación; capa interna: desnitrificación (Martins dos Santos *et al.*, 1996)

3.2. SISTEMAS DE DOS FASES PARA LA NITRIFICACION Y LA DESNITRIFICACION

Aunque el tratamiento de nitrificación y desnitrificación se puede controlar en un sistema de una sola fase, el tratamiento más ampliamente utilizado consiste en la separación de ambas fases. En una primera fase se produce la etapa de oxidación de la nitrificación con la eliminación de la DBO. En la segunda fase de desnitrificación el suministro de carbono y energía se produce por la adición de residuos no tratados para obtener una $\text{DBO} > 2,3$ mg por mg NO_3^- -N (Narkis *et al.*, 1979), o añadiendo una fuente de carbono exógena, siendo la más utilizada el metanol (Nurse, 1980), lo cual encarece el proceso desde el punto de vista económico.

En la Tabla 3 se clasifican los principales sistemas utilizados para realizar los procesos de nitrificación o desnitrificación de modo individualizado.

Tabla 3. Equipos utilizados para los procesos de nitrificación o desnitrificación.

Equipos	Nitrificación	Desnitrificación
Biomasa en suspensión	Lodos activos	Contacto anóxico Tipo UASB
Biomasa adherida	Filtros percoladores Filtros sumergidos Biodiscos Lecho fluido Reactores de corriente de aire ("air-lift")	Filtro anóxico Lecho fluido

3.2.1. Equipos para nitrificación

3.2.1.1. Equipos con biomasa no adherida

3.2.1.1.1. Unidades de lodos activos.

Este proceso es una extensión del tradicional, adaptado para el crecimiento de biomasa autótrofa nitrificante. Se suele trabajar con tiempo de retención celular (TRC) de entre 4 y 7 días para evitar el lavado de los microorganismos que oxidan amonio y nitrito. Para el tratamiento de aguas residuales urbanas medias (DQO, 500 mg L⁻¹ y nitrógeno total, 40 mg L⁻¹), la velocidad de nitrificación no suele ser mayor de 0,2 Kg N/m³ día. La eliminación de materia nitrogenada está limitada, generalmente, por la concentración microbiana (3-5 g SSV L⁻¹), de la cual sólo una pequeña fracción se corresponde a la biomasa nitrificante. Sin embargo, cuando la concentración de materia orgánica es baja, es posible obtener una biomasa con una fracción elevada de microorganismos autótrofos y alta capacidad específica de nitrificación. Con este sistema se han llegado a tratar cargas de hasta 2,3 kg N-NH₄⁺/m³ día para la nitrificación de aguas residuales con una concentración baja de materia orgánica (Wiesmann, 1994).

3.2.1.2. Equipos con biomasa adherida

La inmovilización de bacterias en biopelículas puede lograrse mediante inmovilización natural (van Loosdrecht y Heijnen, 1993, 1996) o empleando técnicas de inmovilización

artificial (Wijffels y Tramper, 1995). En estos sistemas de biopelícula la concentración microbiana suele estar comprendida entre 20 y 30 gSSV L⁻¹. En estos sistemas, la nitrificación no está limitada por la concentración microbiana, sino por la transferencia de oxígeno entre el agua residual y la biopelícula, estando asociada la conversión máxima a la superficie específica del soporte (m² soporte/m³ reactor).

La transferencia de oxígeno en sistemas agitados de biofilms suele ser de entre 10-20 g O₂/m² día (van Loodsrecht y Heijnen, 1993) lo que limita la velocidad de nitrificación a valores de entre 2,2 y 4,4 g N-NH₄⁺/m² día. Experimentalmente, se han determinado velocidades de nitrificación de entre 1 y 2,6 g N-NH₄⁺/m² día en sistemas de biofiltros (Beccari *et al.*, 1993; Anderson *et al.*, 1994); de entre 1,5 y 4,1 g N-NH₄⁺/m² día en sistemas de biodiscos (Beccari *et al.*, 1993; Collins *et al.*, 1988); y de entre 2,4 y 3,1 g N-NH₄⁺/m² día en filtros sumergidos (Nordeit *et al.*, 1994).

3.2.1.2.1. Filtros percoladores

Un filtro percolador o biofiltro consta de un lecho con un soporte sobre el que crece adherida la biomasa que emplea la materia nitrogenada y orgánica del agua residual. Los biofiltros más antiguos empleaban un soporte natural de piedras y guijarros, con baja superficie específica (40-70 m²/ m³), y se utilizaban fundamentalmente para eliminar la fracción orgánica de las aguas residuales. En una segunda generación de filtros con soportes plásticos (poliestireno, cloruro de polivinilo, etc) con mayor superficie específica (de hasta 300 m²/ m³) (Bishop y Kinner, 1986; Capdeville y Rols, 1992), la velocidad de nitrificación está limitada normalmente por la transferencia de oxígeno. A escala industrial existen referencias como la de Anderson *et al.* (1994), en las que se tratan eficazmente cargas de 0,22-0,36 Kg N/m³ día en sistemas con una superficie específica de 140 m²/ m³ o la de Beccari *et al.* (1993), que opera con 0,5-0,8 Kg N/m³ día en sistemas con una superficie específica de 100 m²/ m³. En estos equipos, además de los problemas ocasionados por la presencia de materia orgánica o los debidos a la deficiente transferencia de oxígeno, existen otros factores como la presencia de predadores (gusanos, larvas de moscas, etc) y sólidos en suspensión (Boller *et al.*, 1990; Anderson *et al.*, 1994).

3.2.1.2.2. Filtros sumergidos

Los filtros sumergidos son una modificación de los biofiltros, en los que el lecho sobre el que crecen los microorganismos se mantiene sumergido continuamente en el agua residual (Bishop y Kinner, 1986). Como soportes se emplean diversos materiales como el poliestireno, cerámica, arena y carbón. El soporte ocupa una altura de 2 a 3 metros y tiene una superficie específica comprendida entre 300 y 500 m²/ m³ (Capdeville y Rols, 1992).

La eliminación de amonio en estas unidades depende de factores como una buena distribución del aire, la temperatura del agua, la presencia de materia orgánica, y de una buena gestión de los periodos de lavado del sistema. Con este sistema se han alcanzado velocidades de nitrificación de 0,35 y 1,5 kg N-NH₄⁺/m³ día (Beccari *et al.*, 1993; Fernández-Polanco *et al.*, 1994; Nordeit *et al.*, 1994)

3.2.1.2.3. Biodiscos

Los biodiscos o contactores biológicos rotatorios (CBR), consisten en una serie de placas circulares dispuestas sobre ejes horizontales rotatorios, parcialmente sumergidas en el agua residual, sobre las que se adhiere la biomasa.

La velocidad de rotación de estas unidades suele ser baja (entre 1 y 3 rpm) ya que, aunque velocidades de rotación superiores permiten aumentar la transferencia de oxígeno, elevan los costes energéticos del sistema. Normalmente, sobre un 40% del biodisco se mantiene sumergido en el agua residual (Bishop y Kinner, 1986). El comportamiento del sistema de biodiscos se ve afectado, asimismo, por la presencia de sólidos en suspensión en el influente (Boller *et al.*, 1990). El rendimiento de la unidad puede ser mejorado por cambios periódicos en la dirección de flujo en una serie de CBR, ya que en las últimas etapas y siendo el amonio el substrato limitante, el desprendimiento de biomasa es mayor. Los cambios en la dirección de flujo permiten mantener un biofilm más uniforme en todas las unidades de discos.

Tanto los sistemas de biofiltros como los de biodiscos tienen unas superficies específicas que no exceden de 200-300 m²/m³, lo cual limita la capacidad global de oxidación a algo más de 2 kg O₂/m³ día y la conversión de amonio máxima a 0,8 kg N-NH₄⁺/m³ día (van Loodsrecht y Heijnen, 1993). Estos sistemas constituyen una alternativa atractiva, ya que los requerimientos energéticos de una planta de biodiscos o biofiltros son bajas y su operación es sencilla.

3.2.1.2.4. Reactores de lecho fluido

Las unidades de lecho fluido consisten en torres que contienen arena u otro soporte de tamaño pequeño sobre el que crece la biomasa. La fluidización de las partículas se consigue recirculando el efluente en el que se introduce aire u oxígeno para la oxidación de la materia orgánica y/o nitrogenada. La superficie específica está comprendida entre 2000 y 3000 m²/m³, con concentraciones de biomasa entre 8 y 20 g SSV L⁻¹ (Beccari *et al.*, 1993). A escala de laboratorio, empleando aguas sintéticas con amonio, se han alcanzado velocidades de nitrificación de hasta 9,6 kg N-NH₄⁺/m³ día (Tanaka y Dunn, 1981). A escala piloto se han descrito velocidades de nitrificación de entre 1 kg N-NH₄⁺/m³ día (Cooper y Williams,

1990), hasta 2,6 kg N-NH₄⁺/m³ día (Jeris et al., 1977). En todos estos casos se emplea oxígeno puro.

Estos sistemas no son muy recomendables para la nitrificación, dado que para aguas con un contenido de 110 mg L⁻¹ de N-NH₄⁺ (DQO, 500 Mg L⁻¹), la relación de recirculación ha de ser de 12 a 62 veces si se emplea oxígeno puro o aire respectivamente. Esta recirculación causa problemas de tipo hidráulico, además de elevar los costes de bombeo (van Loosdrecht y Heijnen, 1993).

3.2.1.2.5. Reactores de corriente de aire (air-lift)

Una alternativa al lecho fluido es el reactor de corriente de aire (air-lift) con un tubo interno por el que se introduce una corriente de aire que provoca el arrastre o tiro del líquido y la consiguiente fluidización de las partículas de arena con biomasa. El aire se utiliza tanto para favorecer el contacto entre el líquido y las partículas sólidas como para suministrar el oxígeno necesario para las reacciones de oxidación.

El reactor de corriente de aire (air-lift) con biomasa en suspensión fue desarrollado originalmente para el postratamiento de aguas industriales tratadas anaeróbicamente, existiendo instalaciones industriales en funcionamiento (Heijnen *et al.*, 1990). Dadas las altas concentraciones de biomasa que se alcanzan en estos sistemas, es posible mantener TCR elevados, hasta de varias semanas, lo que permite efectuar el proceso de nitrificación de forma estable, incluso a bajas temperaturas (van Loosdrecht y Heijnen, 1993).

El empleo de reactores "air-lift" permite obtener altas conversiones de amonio, ya que no es necesaria una recirculación externa del efluente para mantener la biomasa en suspensión o suministrar el oxígeno necesario para las reacciones biológicas. La buena transferencia de oxígeno, unido a la alta superficie específica del relleno (hasta 3000 m²/m³), y la alta concentración microbiana (hasta 50 g SSV L⁻¹) permiten obtener altas velocidades de nitrificación, incluso en presencia de otros substratos. A nivel de laboratorio se han descrito conversiones de 5 kg N/m³ día (Tijhuis *et al.*, 1995, Garrido *et al.*, 1996). También se han descrito velocidades de nitrificación de 1,4 kg N/m³ día en una planta piloto de 42 L de capacidad y con concentraciones de amonio de hasta 1000 mg L⁻¹ (Shen-Kun *et al.*, 1991). A nivel industrial, se han descrito velocidades de nitrificación de 1,8 kg N/m³ d en el postratamiento de aguas residuales procedentes de la fabricación de levadura, teniendo lugar simultáneamente la oxidación de sulfuro, amonio y ácidos grasos (Heijnen *et al.*, 1990).

3.2.2. Equipos para desnitrificación

Por razones económicas, existe una clara tendencia a desarrollar reactores capaces de desnitrificar utilizando como fuente de carbono la existente en la propias aguas residuales. Este hecho condiciona el tipo de tecnología a utilizar, habiéndose desarrollado reactores

híbridos en los que el agua bruta se trata en un reactor anaerobio que en cabeza tiene acoplado un reactor anóxico. En este reactor confluyen los nitratos originados en el equipo de nitrificación y el carbono del efluente de la zona anaerobia (Tilche *et al.*, 1994). Un problema importante de estas unidades, es la necesidad de comprobar que la desnitrificación alcance como producto final el N_2 y no algún óxido de nitrógeno.

3.2.2.1. Equipos con biomasa en suspensión

3.2.2.1.1. Contacto anóxico

Este equipo es básicamente el mismo que el utilizado para la digestión anaerobia, y los problemas que plantea son similares: necesidad de una buena distribución de los influentes; agitación para promover un buen contacto; utilización de separadores eficaces que eviten un excesivo lavado de la biomasa, ya que al desprenderse N_2 la separación sólido-líquido se ve afectada, siendo muy importante controlar la recirculación (Mulburguer, 1971). Se han descrito varios ejemplos, entre los que se puede citar una planta piloto capaz de tratar eficazmente $25 L h^{-1}$ utilizando la propia agua residual como fuente de carbono (Szpyrkowicz *et al.*, 1991).

3.2.2.1.2. Reactores tipo UASB (“upflow activated sludge blanket”)

Este tipo de reactor, desarrollado inicialmente para procesos de digestión anaerobia, puede ser adecuado y de una alta eficacia desnitrificante, si se logra obtener un lodo granulado que sea fácilmente retenible en el reactor. Los problemas de operación que plantea son en principio similares a los reactores UASB convencionales, siendo el principal problema el lograr una adecuada distribución del substrato, que esta constituido por nitrato y la fuente de carbono. Se han descrito casos a nivel de laboratorio en los que se ha logrado desnitrificar caudales de entre $3,5$ y $125 L h^{-1}$ en efluentes que contienen hasta $858 mg N-NO_3 L^{-1}$, utilizando como fuente de carbono residuos alcohólicos (Klapwijk *et al.*, 1981).

3.2.2.2. Equipos con biomasa adherida

3.2.2.2.1. Filtro anóxico

Este sistema, derivado del filtro anaerobio, ha sido utilizado en plantas piloto alcanzando rendimientos de desnitrificación entre el 89% y el 98% de la carga de N inicial, con efluentes que contienen entre 20 y $410 mg N-NO_3 L^{-1}$ (Chongrak y Park, 1986). Estos reactores pueden presentar problemas de saturación del soporte, por lo que su diseño es crítico.

3.2.2.2.2. Lecho fluido

El diseño y operación de estas unidades es similar a las unidades de lecho fluido anaerobias, siendo un factor crítico el tipo de soporte. En la Tabla 3 se recogen distintos ejemplos de lechos fluidos en desnitrificación, y el correspondiente tipo de soporte utilizado.

Tabla 4. Lechos fluidos en desnitrificación.

Soporte	Caudal (L h ⁻¹)	Fuente C	Concentración (mg N-NO ₃ ⁻ L ⁻¹)	Carga N (g N-NO ₃ ⁻ L ⁻¹ d ⁻¹)	Referencia
Arena	0,6	—	30	0,3	Kurt <i>et al.</i> , 1987
Plástico	1,1-2,9	Acetato	25	3,3-6,6	Lazarova <i>et al.</i> , 1992
Arena	72	Metanol	15-20	—	McDonald, 1990
Arena	—	Metanol	22	—	Jeris y Owens, 1975

4. TRATAMIENTOS PARA LA ELIMINACION DE ALTAS CONCENTRACIONES DE NITRATO

Los procesos de nitrificación-desnitrificación mencionados en el apartado anterior han demostrado ser útiles para la desnitrificación de aguas con bajo contenido en nitrógeno (<50 mg L⁻¹). Por el contrario, el potencial de estos procesos ha sido escasamente probado en aquellos casos en que la cantidad de nitrógeno, especialmente NO₃⁻, es > 1000 mg L⁻¹, y en ausencia de cantidades significativas de materia orgánica biodegradable.

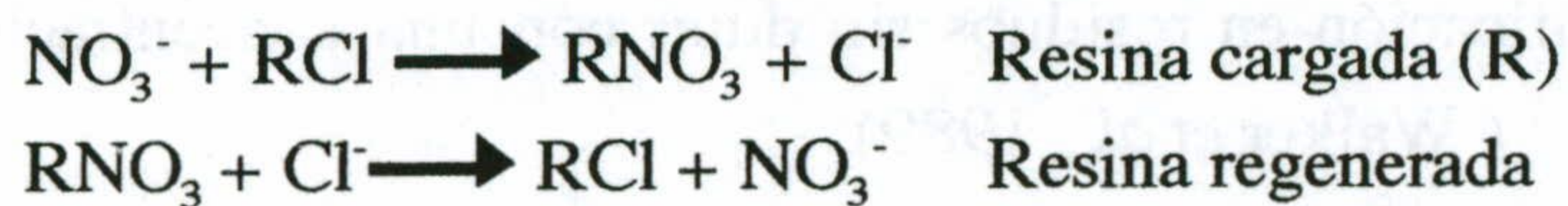
Existen distintos tipos de industrias, como las mencionadas en la Tabla 1, que producen aguas residuales cuyo contenido en nitrato es de entre 5000 y 50000 mg NO₃⁻ L⁻¹ (Clark *et al.*, 1975; Francis y Makin, 1977; Lawson, 1981; Pitt *et al.*, 1981; Walker *et al.*, 1989). Estas aguas requieren un tratamiento previo, en la propia industria que las genera, para la eliminación del nitrato hasta niveles aceptables antes de su vertido a las plantas de tratamiento convencionales.

Para el previo tratamiento de estas aguas se han descrito distintos procedimientos:

4.1. TRATAMIENTOS NO BIOLÓGICOS

4.1.1. Intercambio iónico

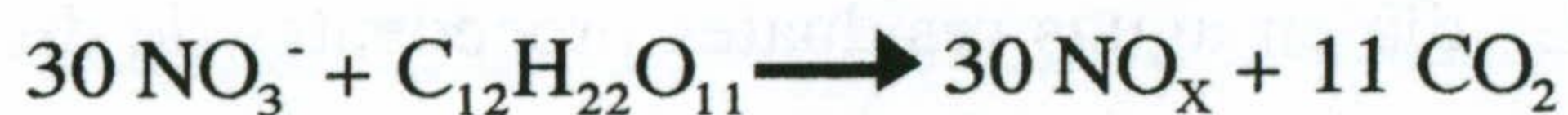
El intercambio iónico se usa para la recuperación de altas concentraciones de nitrato en la industria de fertilizantes. Este método intercambia el nitrato por el cloruro. El nitrato es atrapado en una columna con NaCl o HCl concentrado, dando como resultado NaNO_3 o HNO_3 , el cual puede ser vertido o reciclado dependiendo del interés posterior. Las desventajas de éste proceso son la necesidad de añadir cloruro al agua residual y la eliminación posterior del NaNO_3 concentrado (Pitt *et al.*, 1981).



También se han descrito procesos en los que se combina el proceso de intercambio iónico con un postratamiento biológico (van der Hok *et al.*, 1987, 1988a; Clifford y Liu, 1993)

4.1.2. Reducción química con azúcares

La reducción química de nitrato con azúcares o formaldehído da lugar a NO_x y CO_2 como productos de desecho gaseosos. El proceso consiste en el calentamiento a 100°C de una mezcla de azúcar y residuos ricos en nitrato durante al menos 24 horas. Cuanto más concentrado está el residuo, más rápida es la reducción, por lo que a veces se procede a la concentración del residuo, lo cual encarece mucho el sistema.



Este proceso no elimina nitrato hasta los niveles de vertido legales ($10\text{-}20 \text{ mg L}^{-1}$), el nivel mínimo de nitrato que se obtiene es de 5000 mg L^{-1} , por lo que este residuo debe ser diluído después del tratamiento para su vertido. Además existen desventajas adicionales, como la alta concentración residual de carbono en el residuo, lo cual incrementa la DBO, y las descargas de NO_x , que están siendo reguladas y se prohíbe su vertido (Pitt *et al.*, 1981).

4.2 TRATAMIENTO BIOLÓGICO (DESNITRIFICACION)

Varios autores han propuesto el sistema de desnitrificación para el tratamiento de aguas con altas concentraciones de nitrato como el más apropiado y económico (Pitt *et al.*, 1981). Como fuente de carbono se utiliza normalmente metanol, etanol o acetato. Los reactores más comunmente utilizados son los mencionados en la Tabla 2.

Para el tratamiento de aguas con una concentración de N-NO_3^- superior a 1000 mg L^{-1} se hace necesario, en la mayoría de los casos, la dilución de los residuos antes de su tratamiento. Este hecho ha sido ampliamente descrito por varios autores (Francis y Makin, 1977; Lawson, 1981; Walker *et al.*, 1989). En estos casos, la tasa de desnitrificación varía dependiendo de la dilución a la que previamente se somete el residuo, e incluso se ha descrito la inhibición de la desnitrificación en residuos sin diluir con una concentración de aproximadamente $6000 \text{ mg NO}_3^- \text{ L}^{-1}$ (Walker *et al.*, 1989).

En los sistemas para el tratamiento de aguas con alto contenido en nitrato, la tasa de desnitrificación se ve afectada por parámetros físico-químicos tales como el pH (Hund *et al.*, 1993) y la temperatura (Walker *et al.*, 1989; Lawson, 1981). El control de pH es crítico para el buen funcionamiento del sistema de desnitrificación, observándose una gran acumulación de nitrito en los efluentes tratados sin control de éste parámetro (Clark *et al.*, 1976; Hund *et al.*, 1993, Krishnamachari y Clarkson, 1993; Walker *et al.*, 1989). También es muy importante el control de los requerimientos nutricionales, tales como el fosfato y otros micronutrientes (Clark *et al.*, 1976; Lawson, 1981). Otro factor importante es la fuente de carbono utilizada (Blaszczyk), así como la razón C/N existente en el medio de cultivo (Clark *et al.*, 1976; Clifford y Liu, 1993). Estos sistemas pueden verse limitados por la presencia de determinados compuestos, tales como SO_4^{2-} , metales pesados (Kamath *et al.*, 1992), sales (Clifford y Liu, 1993; Lawson, 1981), y carbonato cálcico (Walker *et al.*, 1989), y debe tenerse en cuenta para la aplicación práctica del proceso.

Teniendo en cuenta todos estos factores se han descrito tasas de desnitrificación de entre $6 \text{ g N-NO}_3^- \text{ L}^{-1} \text{ día}$ y $80 \text{ g N-NO}_3^- \text{ L}^{-1} \text{ día}$ en aguas residuales procedentes de distintos tipos de industrias (Clarkson *et al.*, 1991; Hund *et al.*, 1993; Pitt *et al.*, 1981; Walker *et al.*, 1989). En todos los casos, la tasa de desnitrificación depende de la concentración de nitrato en el influente, siendo pues éste el factor limitante para el tratamiento de este tipo de residuos. En la mayoría de estos casos se encontró acumulación de nitrito en el efluente (Clarkson *et al.*, 1991; Clifford y Liu, 1993; Francis y Makin, 1977; Krishnamachari y Clarkson, 1993), por lo que su descarga no está permitida por las agencias del medio ambiente (MOPU).

OBJETIVOS



Como se ha visto en la introducción de este trabajo, el tratamiento de aguas residuales con altas cargas de nitrato es un área donde aún no se han conseguido resultados totalmente satisfactorios, y por tanto, era necesario plantear nuevos sistemas de tratamiento que pudieran conducir a una mejora de los procesos existentes.

El trabajo que se presenta en esta Tesis Doctoral se desarrolló en colaboración con Unión Española de Explosivos (UEE). Los objetivos del mismo estaban encaminados a establecer las condiciones que permitieran mejorar el tratamiento de los residuos producidos en la fabricación de explosivos. En particular, dentro de este trabajo se ha contemplado el tratamiento de aguas residuales procedentes de la síntesis de dinitroetilenglicol, las cuales contienen altas cargas de nitrato. Los objetivos concretos son:

1. Aislamiento y caracterización de microorganismos tolerantes a altas concentraciones de nitrato, capaces de utilizar este compuesto como única fuente de nitrógeno.
2. Determinación de las condiciones óptimas de operación para la eliminación de nitrato sin acumulación de nitrito, u otro tipo de metabolitos tóxicos, en los efluentes tratados.
3. Optimización del proceso, desde el punto de vista económico, para su viabilidad a nivel industrial. Dentro de este objetivo se hicieron esfuerzos para reducir los costes derivados del suministro de nutrientes al medio de cultivo, así como el debido a la adición de una fuente de carbono exógena.
4. Mejora genética de una cepa perteneciente al género *Klebsiella*, aislada en este estudio, mediante un aumento en la dosis génica de nitrito reductasa, con el fin de favorecer la eliminación de altas concentraciones de nitrato.

Faint header text at the top of the page, possibly containing a date or page number.

First paragraph of faint text, starting with a capital letter.

Second paragraph of faint text, continuing the narrative or list.

Third paragraph of faint text, possibly a concluding sentence for a section.

Fourth paragraph of faint text, appearing as a separate block.

Fifth paragraph of faint text, continuing the main body of the document.

Sixth paragraph of faint text, possibly a transition or separator.

Seventh paragraph of faint text, appearing as a distinct section.

Eighth paragraph of faint text, continuing the content.

Ninth paragraph of faint text, possibly a final paragraph in the main body.

Tenth paragraph of faint text, appearing as a separate block.

Eleventh paragraph of faint text, continuing the content.

Twelfth paragraph of faint text, possibly a concluding paragraph.



MATERIALES Y METODOS



1. CEPAS BACTERIANAS

En este trabajo se han utilizado cepas bacterianas de colecciones de cultivos tipo, así como de la colección del grupo de Degradación de Tóxicos Orgánicos de Granada. También se ha llevado a cabo el aislamiento de cepas del suelo con capacidades metabólicas determinadas, cuyas características se describen en el apartado correspondiente de la sección de Resultados.

Las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo junto con sus características más relevantes se recogen en la Tabla 5.

2. CONSERVACION DE CEPAS BACTERIANAS

La conservación de cepas a corto plazo se hizo en cultivos en estría en placas de medios mínimos selectivos a 4°C. La conservación a largo plazo se hizo por congelación de cultivos líquidos en 40% (v/v) de glicerol a -20°C y -70°C.

3. MEDIOS DE CULTIVO

La composición de los medios de cultivo utilizados en este trabajo se detalla a continuación. Todos los medios y soluciones se esterizaron por calor húmedo en un autoclave a 115°C y 1 atmósfera de presión, o por filtración utilizando filtros de 0,22 μm de diámetro de poro.

3.1. MEDIOS RICOS

Las cepas se crecieron en medio rico de Luria-Bertani (LB) (Maniatis *et al.*, 1982). Para la preparación de medio sólido se añadió bactoagar 1,5% (p/v). En el caso de requerirse un medio sólido diferencial para la expresión del gen de la β -galactosidasa se utilizó LB suplementado con 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-gal), un análogo de la lactosa cuya hidrólisis por el enzima β -galactosidasa produce un compuesto insoluble en agua de color azul. El medio se suplementó con isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) con objeto de bloquear la represión por LacI. Los clones que presentaron actividad β -galactosidasa se reconocieron como colonias azules en este medio, frente a colonias sin coloración que no expresaron el enzima. El X-gal se adicionó al medio de cultivo a una concentración de 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a partir de una solución 2% (p/v) en N,N-dimetilformamida que se conservó a -20°C. El IPTG se añadió a concentración 0,2 mM a partir de una solución 100 mM esterilizada por filtración y almacenada a -20°C.

Tabla 5. Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo.

Estirpe	Características	Fuente o Referencia
<i>Klebsiella</i>		
<i>K. oxytoca</i> CECT 4460	(NO ₃ ⁻) ⁺ , Ap ^r , Nal ^r	Este trabajo
<i>K. pneumoniae</i> 50231	(NO ₃ ⁻) ⁺	Este laboratorio
<i>K. planticola</i> CECT 843	(NO ₃ ⁻) ⁺	CECT
<i>K. oxytoca</i> CECT 860	(NO ₃ ⁻) ⁺	CECT
<i>Escherichia coli</i>		
ET8000	Nal ^r , Lac ⁻	McNeil <i>et al.</i> , (1982)
JM109	Ap ^r	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , (1985)
HB101	Sm ^r	Boyer y Roulland-Dussoix, (1969)
CC118 λ PIR	CC118 lisogenizada con el fago λpir	Herrero <i>et al.</i> , (1990)
<i>Pseudomonas</i>		
<i>P. putida</i> 2440	Cm ^r	Franklin <i>et al.</i> , (1981)
<i>Arthrobacter</i>		
<i>A. globiformis</i> CECT 4500	(NO ₃ ⁻) ⁺ , Nal ^r , Km ^r	Este trabajo
<i>A. globiformis</i> CECT 388	(NO ₃ ⁻) ⁺	CECT
<i>Bacillus</i>		
<i>B. subtilis</i>	(NO ₃ ⁻) ⁺	Este laboratorio

3.2. MEDIOS MINIMOS

3.2.1. Cultivos estancos.

Para el cultivo estanco de células se utilizó medio M8 como medio mínimo (Abril *et al.*, 1989) cuya composición final (por L de agua) fue la siguiente: Na_2HPO_4 , 2,7 g; KH_2PO_4 , 3 g; NaCl , 0,5 g; MgSO_4 , 120,4 mg; citrato férrico amónico, 6 mg; ZnCl_2 , 0,125 mg; $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$, 0,075 mg; H_3BO_3 , 0,75 mg; $\text{CoSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 mg; $\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0,025 mg; NiCl_2 , 0,05 mg y NaMoO_4 , 0,075 mg. Las soluciones empleadas en este medio se prepararon y esterilizaron por separado en el autoclave.

Como fuente de nitrógeno se utilizó KNO_3 comercial, o bien NO_3^- presente en las aguas de lavado en la fabricación de dinitroetilenglicol, en la fábrica de Paramo de Masa (Quintanilla de Sobresierra, Burgos) perteneciente a Unión Española de Explosivos. La composición de las aguas de lavado fue la siguiente: NO_3^- , 15-50 g L^{-1} ; SO_4^{2-} , 1 g L^{-1} ; DNEG, 0,05% (p/v). Las distintas concentraciones empleadas se especifican en el correspondiente apartado de Resultados.

Como fuentes de carbono se utilizaron las que se detallan a continuación:

a) Azúcares: glucosa, fructosa, lactosa y sacarosa, las cuales se prepararon en soluciones madre al 20% (p/v), se esterilizaron en el autoclave, y se añadieron al medio para alcanzar las concentraciones finales especificadas en los correspondientes apartados de Resultados.

b) Alcoholes: el glicerol comercial [80% (v/v)] se esterilizó en el autoclave. Etilenglicol de alta pureza fue suministrado por Unión Española de Explosivos. Las concentraciones finales utilizadas se detallan en los correspondientes apartados de Resultados.

Para la preparación de medios sólidos se añadió bactoagar 2% (p/v) o agar noble 2,25% (p/v).

3.2.1. Cultivos continuos.

Para el cultivo de células en continuo se utilizó una modificación del medio M8 (Abril *et al.*, 1989) suplementado según Egli y Fietcher, (1981). El medio contenía (por L de agua): KNO_3 , 2,02 g; KH_2PO_4 , 5,65 g; NaCl , 0,5 g; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 2,46 g; $\text{EDTA} \times 2\text{H}_2\text{O}$, 82 mg; ZnCl_2 , 1,25 mg; $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$, 0,75 mg; H_3BO_3 , 7,5 mg; $\text{CoSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 5 mg; $\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0,25 mg; $\text{NiCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, 0,5 mg; $\text{NaMoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0,75 mg y $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$, 7 mg. Antes de la esterilización por calor, todos los componentes del medio se mezclaron y después se acidificó con H_2SO_4 hasta pH 3. La fuente de carbono fue esterilizada por separado y se añadió al medio de cultivo una vez enfriado para alcanzar una concentración final de 10 g L^{-1} .

3.3. ANTIBIOTICOS

Las soluciones de antibióticos se prepararon 1000 veces concentradas en H₂O destilada, salvo la tetraciclina y el cloranfenicol que se prepararon en etanol absoluto, y la rifampicina que se preparó en metanol. Se esterilizaron por filtración a través de filtros estériles de nitrocelulosa de 0,22 μm de diámetro de poro.

Los antibióticos se utilizaron a las siguientes concentraciones finales en el medio ($\mu\text{g mL}^{-1}$): ácido nalidíxico, 10-20; ampicilina, 100; cloranfenicol, 30; estreptomina, x; kanamicina 25-50; rifampicina, 10-50; tetraciclina, 10.

4. CONDICIONES DE CULTIVO

4.1. CULTIVOS ESTANCOS

Los cultivos estancos se hicieron en matraces, con un volumen de cultivo entre el 25 y el 35% del volumen del matraz y se incubaron con agitación orbital (200 rpm) a 30°C. Cuando se indica, las bacterias se cultivaron en fermentadores de 2 L (Biostat B, Braun-Biotech), 20 L (Afora) o 50 L (UEE) bajo las condiciones operacionales especificadas en los correspondientes apartados de Resultados.

4.2. CULTIVOS CONTINUOS

Los cultivos continuos, se llevaron a cabo en fermentadores de 1,5 L (reactor, KLS Bioengineering, Wald, Switzerland) con un volumen de trabajo de 1 L. La tasa de aireación fue de un volumen de aire por volumen de cultivo líquido por minuto. La agitación se mantuvo constante a 1000 rpm. El pH se mantuvo a un valor de 7 mediante la adición automática de 1 M NaOH/ KOH y la temperatura se mantuvo constante a $30 \pm 0.1^\circ\text{C}$.

5. ENRIQUECIMIENTO, AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE BACTERIAS INDIGENAS DEL SUELO

5.1. ENRIQUECIMIENTO Y AISLAMIENTO DE BACTERIAS

Diez g de suelo de la fábrica de UEE en Quintanilla de Sobresierra (Burgos) se añadieron a 90 mL de medio M8 más la fuente de carbono y nitrógeno para la cual se deseaba seleccionar el microorganismo de interés (ver detalles específicos en el apartado de Resultados). Tras mantener

8.1. METODO DE LA LISIS ALCALINA

8.1.1. Aislamiento de plásmidos a pequeña escala

Para el aislamiento de plásmidos a pequeña escala se utilizó el método de la lisis alcalina de Maniatis *et al.*, (1982) modificado por M. Herrero (comunicación personal). Se partió de 1,5 mL de cultivo, las células se recogieron por centrifugación a 12000g durante 5 minutos. Tras eliminar el sobrenadante, éstas se resuspendieron en 100 μ L de GTE y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación se añadieron 200 μ l de solución de lisis, se agitó el tubo suavemente por inversión y se incubó durante 5 minutos en hielo. El lisado se neutralizó añadiendo 150 μ L de acetato sódico pH 4,8 y tras agitar vigorosamente con el tubo invertido, se mantuvo la mezcla a -20°C durante 15 minutos. Los restos celulares, proteínas y ADN cromosómico se eliminaron por centrifugación a 12000g durante 5 minutos y el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio. Posteriormente se añadió 1 mL de etanol absoluto frío, y la mezcla se incubó a -20°C durante 30 minutos. Para precipitar el ADN se centrifugó a 12000g durante 15 minutos. El precipitado se lavó con etanol 70% (v/v) y se centrifugó a 12000g durante 5 minutos. El sedimento de ADN se secó al vacío y se resuspendió en 25-50 μ L de TE. La composición de las soluciones empleadas en este procedimiento fue la siguiente:

GTE: Glucosa, 50 mM; Tris-HCl, 25 mM; EDTA-Na₂, 10 mM.

La solución se esterilizó en el autoclave y se conservó a 4°C. El método original incluía en esta solución lisozima (4 mg mL⁻¹) que se añadía en el momento de su uso. Sin embargo, habitualmente se obtuvo una rotura de paredes celulares satisfactoria en su ausencia, por lo que se solía omitir.

Solución de lisis: SDS 1% (p/v) y NaOH 0,2 N.

Esta solución fue de preparación extemporánea a partir de soluciones madre de SDS al 10% (p/v) y 2 N de NaOH.

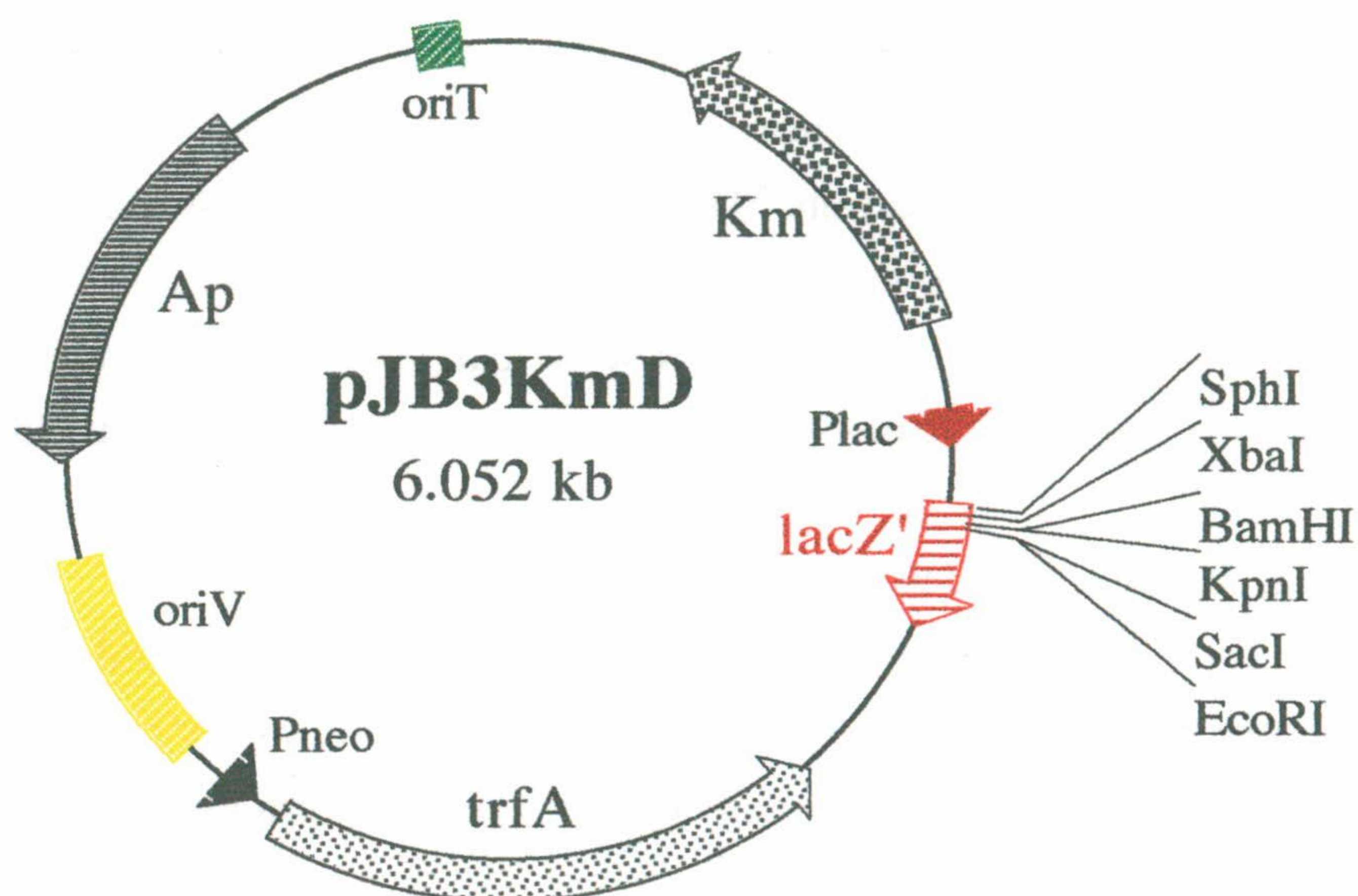
Tampón acetato sódico pH 4,8.

A 60 mL de una solución de acetato sódico 5 M se le añadieron 11,5 mL de ácido acético glacial y H₂O hasta 100 mL. Cuando fue necesario, el pH se ajustó a 4,8 con ácido acético glacial. La solución se esterilizó en el autoclave y se conservó a 4°C.

8.1.2. Aislamiento de plásmidos por el método “Qiapreps”

El sistema “Qiapreps spin plasmid kit” se utilizó para la preparación rápida de ADN plasmídico libre de ARN para su uso en clonación, partiendo de un volumen de 3 mL de cultivo y siguiendo las instrucciones del fabricante (Qiagen, ref. 27104).

Figura 8. Esquema del plásmido pJB3KmD.



Se muestran los sitios de restricción únicos para los enzimas que se indican. Se indica la localización de los orígenes de replicación y de transferencia (representados en cajas abiertas) y la de los genes de resistencia a ampicilina y a kanamicina, lacI y el fragmento α de lacZ. Las distintas flechas indican el sentido de la transcripción de los genes.

la suspensión en agitación durante una semana a 30°C, se realizaron diluciones seriadas que se sembraron en placas de medio selectivo. Las colonias que aparecieron en placas se purificaron mediante sucesivas estrías en medio mínimo hasta que en las placas de medio selectivo apareció un solo tipo de colonia. La pureza de los cultivos se comprobó mediante observación al microscopio de cultivos teñidos o no con el método de Gram y ensayos de API (ver la siguiente sección).

5.2. IDENTIFICACION Y CARACTERIZACION DE BACTERIAS AISLADAS DEL SUELO

Las bacterias aisladas se caracterizaron utilizando procedimientos standard, tales como tinción de Gram y ensayos fisiológicos y metabólicos.

La tinción de Gram de bacterias aisladas del suelo se realizó utilizando el sistema "Accustain Gram Stain" de la casa comercial Sigma (ref. HT90).

Para la identificación de estas bacterias se utilizaron los sistemas de identificación de la casa comercial Biomérieux para enterobacterias API-20E (ref. 2010) y para bacterias gram-negativas no enterobacteriaceas API 20NE (ref. 2005). Estos paquetes comerciales permitieron la realización de distintas pruebas metabólicas a partir de suspensiones bacterianas.

Cuando se indica los cultivos puros se sometieron a ensayos de perfil de fosfolípidos mediante análisis gases-masas realizados por la compañía Microbial Identification Systems (Analytical Services, Williston, VT 05495, USA)

6. DETERMINACION DE LA BIOMASA BACTERIANA

La biomasa fue determinada mediante la medida de peso seco. Cinco mL de cultivo bacteriano se filtraron a través de filtros secos y prepesados de 0,45 μm de tamaño de poro y 47 mm de diámetro, Whatman (ref. 1822 915) o Millipore (Bedford, MA, USA). Cada muestra se filtró por duplicado. Los filtros se secaron a 105°C hasta alcanzar un peso constante.

7. PLASMIDOS

En la tabla 6 se relacionan los plásmidos utilizados en este trabajo junto con sus características más relevantes. Los plásmidos de nueva construcción se describen en la correspondiente Sección de Resultados.

Tabla 6 . Plásmidos utilizados en este trabajo.

Plásmidos	Características	Referencia
pAH94	Promotor en tandem Pr1, Pr2 de XylR	Holtel <i>et al.</i> , (1992)
pJB3KmD	Km ^r , Ap ^r , IncP1, mob ⁺ , tra ⁻	Blatny, J. M., (1997)
pMMN148	Cm ^r , nasBCDEF de <i>B. subtilis</i>	Nakano <i>et al.</i> , (1995)
pRK600	Cm ^r , mob RK2, tra RK2	Kessler <i>et al.</i> , (1992)
pUC18NotI	Ap ^r , NotI/polilinker	Herrero <i>et al.</i> , (1990)
pUPE2	Km ^r , Ap ^r , <i>nasB</i> clonado entre los sitios <i>Bam</i> HI y <i>Kpn</i> I en pJB3KmD	Este trabajo
pUPE3	Km ^r , Ap ^r , Pr clonado entre los sitios <i>Sph</i> I y <i>Xba</i> I en pUPE2	Este trabajo
pUPE4	Ap ^r , <i>nasB</i> clonado entre los sitios <i>Bam</i> HI y <i>Kpn</i> I en pUC18NotI	Este trabajo
pUPE5	Km ^r , Ap ^r , <i>nasB</i> clonado entre los sitios NotI en pUT mini-Tn5 Km1	Este trabajo
pUT/mini-Tn5 Km1	Km ^r , Ap ^r , ori R6K, mob RP4, donación suicida del transposón mini-Tn5 Km1	de Lorenzo <i>et al.</i> , (1990)
pVJS615	Ap ^r , nasBANarXL de <i>K. pneumoniae</i>	Stewart <i>et al.</i> , (1993)

8. AISLAMIENTO DE ADN PLASMIDICO

Para el aislamiento de ADN plasmídico se utilizaron los métodos que se describen a continuación, dependiendo del grado de pureza requerido para el uso posterior del ADN y del volumen inicial de cultivo.

La cepa bacteriana portadora del plásmido de interés se cultivó con agitación durante 6-14 horas a 30°C en medio suplementado con los antibióticos correspondientes.

9. TRANSFORMACION DE ESCHERICHIA COLI

9.1 PREPARACION DE CELULAS COMPETENTES

La preparación de células competentes de *E. coli* para su transformación posterior se hizo según el método de Nishimura *et al.*, (1990). La cepa correspondiente de *E. coli* se inoculó en 3 mL de LB suplementado con los antibióticos adecuados, y se incubó a 37°C con agitación durante 12-16 horas. Este cultivo se diluyó 100 veces en 50 mL de solución A y se incubó a 37°C con agitación hasta alcanzar la fase exponencial temprana de crecimiento ($A_{660}=0,6-0,8$). A partir de este momento se trabajó en frío, ya que la eficiencia de transformación es de este modo 100 veces superior. Las células se mantuvieron en un baño de hielo durante 10 minutos, y se recogieron por centrifugación a 12000g durante 5 minutos a 4°C. A continuación se resuspendieron cuidadosamente en 0,5 mL de solución A. Posteriormente se añadieron 2,5 mL de solución B y se mezcló suavemente. La suspensión celular se repartió en alícuotas de 150 μ L que se mantuvieron a -70°C hasta el momento de su uso.

Las soluciones empleadas en este método se conservaron a 4°C y su composición fue la siguiente:

Solución A: LB suplementado con $MgSO_4 \times 7H_2O$, 10 mM y glucosa, 0,2% (p/v).

Solución B: LB suplementado con glicerol, 36% (v/v); polietilenglicol-8000, 12% (p/v) y $MgSO_4 \times 7H_2O$, 12 mM.

9.2. TRANSFORMACION

Para la transformación de células con ADN plasmídico, una alícuota de células mantenida a -70°C se transfirió a un baño de hielo y se añadieron 1-10 μ L de la solución de ADN en TE (de 0,1-1 μ g). La mezcla se incubó durante 45-60 minutos en hielo con agitación ocasional. Las células se sometieron a choque térmico transfiriéndolas a 42°C durante 2-5 minutos y se transfirieron de nuevo a un baño de hielo durante 5-10 minutos. Posteriormente se añadió 1 mL de LB y las células se incubaron a 30°C durante 1-3 horas en agitación para permitir la expresión de los genes de resistencia a antibióticos codificados por el plásmido introducido. Las células transformantes se seleccionaron sembrando alícuotas de 50-200 μ L en placas de LB sólido suplementado con los antibióticos adecuados. Las placas se incubaron a 30°C hasta la aparición de colonias.

10. TRANSFERENCIA DE PLASMIDOS POR CONJUGACION

La conjugación bacteriana se utilizó para la transferencia de ADN plasmídico a *Klebsiella oxytoca* CECT 4460. El sistema utilizado fue el denominado "triparental". En este sistema de cruce, las funciones de transferencia (*tra*) son aportadas en *trans* por un plásmido auxiliar autotransferible (pRK600), el cual moviliza el plásmido en cuestión; de esta forma, la bacteria portadora del plásmido auxiliar también forma parte del cruce (de Lorenzo *et al.*, 1990). Este sistema implica que las cepas donadora y receptora, así como la cepa auxiliar, deben estar marcadas adecuadamente con resistencias a antibióticos o con capacidades metabólicas específicas que permitan la selección de los transconjugantes y la contraselección de donadores, receptores y cepa auxiliar.

Se partió de cultivos de las cepas donadora y receptora del plásmido en cuestión, así como de la cepa portadora del plásmido auxiliar, que habían sido cultivadas a 30°C con agitación durante 12-16 horas. Aproximadamente 10^8 células de cada cultivo se recogieron por centrifugación a 12000g durante 5 minutos, y las células sedimentadas se lavaron 2 veces con 1 mL de medio 1xM8. Posteriormente las células se mezclaron y se recogieron juntas por centrifugación a 12000g durante 5 minutos. A continuación se suspendieron en 100 μ L de 1xM8 y la suspensión bacteriana se depositó sobre un filtro de nitrocelulosa estéril de 0,22 μ m de diámetro de poro colocado sobre la superficie de una placa de LB sólido, incubándose a 30°C durante 16-20 horas. Transcurrido este tiempo, el filtro con las células se colocó en un tubo con 5 mL de medio 1xM8, y las células se resuspendieron por agitación. A partir de esta suspensión se hicieron diluciones seriadas en el mismo medio y se sembraron placas de medio selectivo para los transconjugantes. Las placas se incubaron a 30°C hasta la aparición de los transconjugantes. Las cepas donadora, receptora, y auxiliar, se sometieron al mismo tratamiento y se sembraron en placas del mismo medio selectivo, sirviendo de esta manera como controles negativos de la conjugación.

Simultáneamente se hicieron siembras en los medios correspondientes para el crecimiento de las cepas donadora, receptora, y auxiliar, con objeto de realizar el conteo del número de bacterias totales iniciales presentes en el cruce.

11. MANIPULACION DE ADN

11.1. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE ADN

Para estimar la concentración de ADN de una solución se utilizó el método espectrofotométrico descrito por Maniatis *et al.*, (1982).

Se determinó la absorbancia de la solución de ADN a 260 nm y 280 nm, frente a un blanco de H₂O o TE dependiendo de lo utilizado para la disolución del ADN. La concentración de ADN de la muestra se calculó respecto al valor estándar de $A_{260}=1$ para soluciones con 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ADN de cadena doble. La relación A_{260}/A_{280} se utilizó para estimar el grado de pureza de la preparación, de forma que valores de esta relación por debajo de 1,8 se consideraron indicadores de contaminación por proteínas y/o fenol.

11.2. RESTRICCIÓN DE ADN

Las digestiones de ADN con enzimas de restricción se realizaron en las condiciones óptimas para cada enzima fijadas por el fabricante.

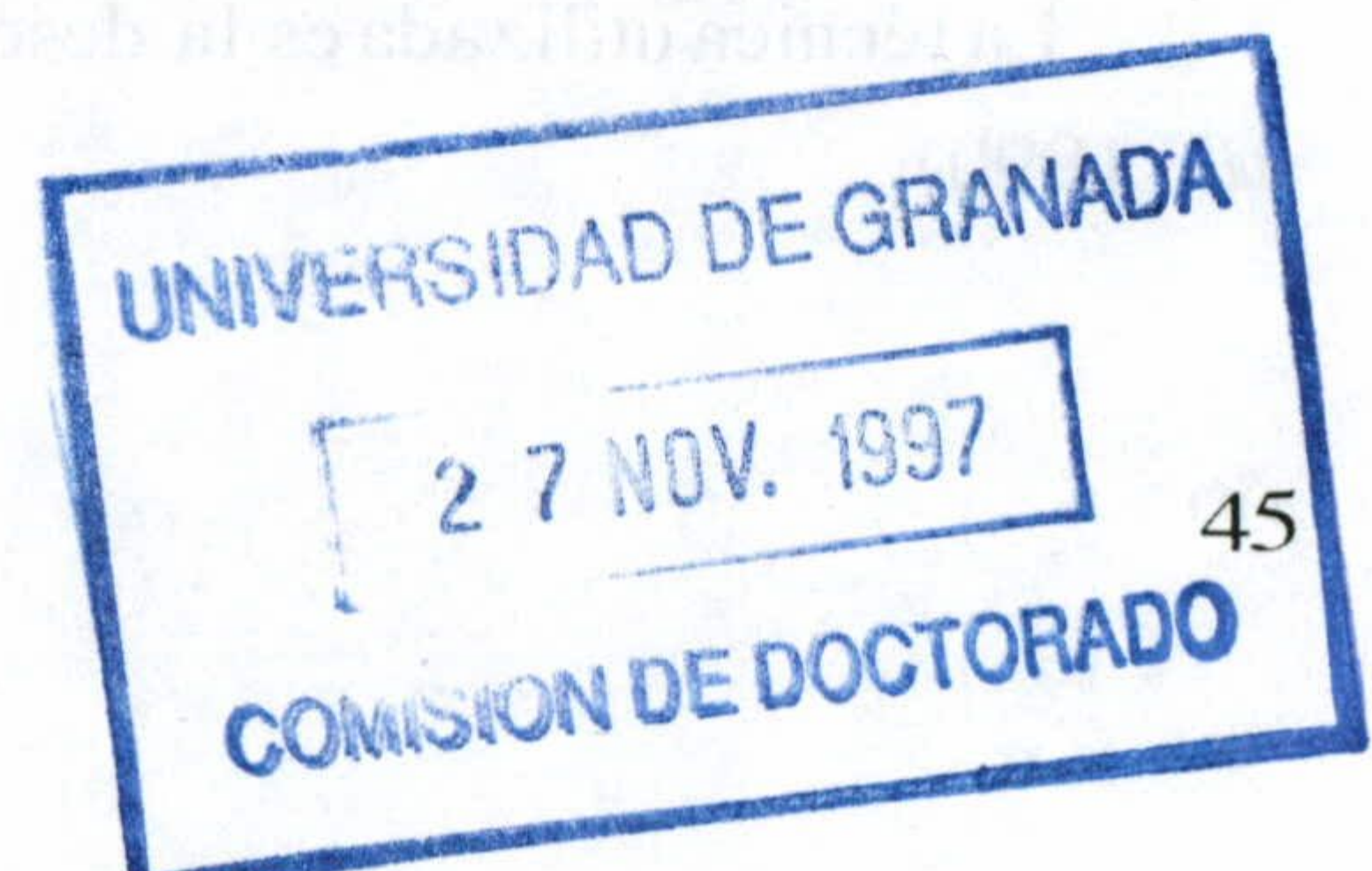
Las reacciones contenían habitualmente 0,5-5 μg de ADN, 0,1 volumen del tampón de restricción correspondiente suministrado por la casa comercial (10 veces concentrado), y 0,5-5 unidades del enzima de restricción, en volúmenes finales de 10-30 μL completados con H₂O o TE. Las digestiones se llevaron a cabo incubando las mezclas de reacción durante 2-12 horas, a la temperatura indicada por el fabricante.

11.3. SEPARACIÓN DE MOLECULAS DE ADN MEDIANTE ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

La separación y visualización tanto de plásmidos completos como de fragmentos de ADN originados por digestión con enzimas de restricción, se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa. Por cada muestra a analizar se añadió 1 μL de tampón de carga y la mezcla se depositó en un pocillo de un gel de agarosa al 0,8% (p/v) en TAE, sumergido en una cubeta con el mismo tampón. La separación de fragmentos de ADN se realizó por electroforesis horizontal sumergida a un voltaje de 5-10 V cm^{-1} .

Las moléculas de ADN se tiñeron por inmersión en una solución con bromuro de etidio (1 $\mu\text{g mL}^{-1}$) durante 10 minutos y, tras lavar en agua para eliminar el exceso de bromuro de etidio, el ADN se visualizó mediante exposición del gel a luz ultravioleta (254 nm). El tamaño de los fragmentos se estimó por interpolación en curvas logarítmicas del tamaño de cada fragmento frente a su movilidad relativa, utilizando como patrón los fragmentos del ADN del fago λ cortado con el enzima de restricción *HindIII* o con los enzimas *HindIII* y *EcoRI*.

La composición de los tampones y soluciones empleados en este procedimiento fue la siguiente:



Tampón TAE: Tris-base, 4,84 g; ácido acético glacial, 1,14 mL; EDTA-Na₂ 0,5 M pH 8, 2 mL y H₂O hasta 1 litro. Este tampón se preparó a partir de una solución 50 veces concentrada y esterilizada en el autoclave.

Tampón de carga: glicerol, 30% (v/v); azul de bromofenol, 0,3% (p/v).

Los marcadores de peso molecular se prepararon de la siguiente forma: se cortaron 80 μ L de ADN del fago λ (250 μ g mL⁻¹) con 1,5 unidades/ μ g ADN de los enzimas *Hind*III y, en su caso, *Eco*RI. Una vez digerido el ADN, se calentó a 80°C para separar las regiones *cos* de λ , y a la reacción se añadieron finalmente 80 μ L de tampón de carga, completándose el volumen hasta 400 μ L con TE, de forma que la concentración final de ADN en la solución fue de 50 μ g mL⁻¹.

11.4. RECUPERACION DE MOLECULAS DE ADN DE GELES DE AGAROSA

Una vez identificado el fragmento de ADN que se quería recuperar, se cortó el trozo de agarosa del gel que contenía el fragmento con ayuda de un bisturí y se extrajo del mismo. El ADN se recuperó utilizando los sistemas comerciales "GeneClean" (BIO101 Inc.) y "Prep-A-Gene" (Bio-Rad ref. 732-6010), según las instrucciones de los fabricantes.

11.5. LIGACION DE ADN

Para la ligación de moléculas de ADN se partió de fragmentos lineales obtenidos por digestión con enzimas de restricción en sitios compatibles para la ligación. Se partió, por un lado, de vector linearizado, y por otro de un fragmento de ADN obtenido por digestión con uno o varios enzimas de restricción y purificado como se ha descrito en los apartados 11.3. y 11.4. Estas moléculas se mezclaron en una proporción vector:inserto de 1:3. La reacción se llevó a cabo añadiendo 0,1 volúmenes de tampón de ligación (suministrado por el fabricante) y 1 unidad de ligasa del fago T4 en un volumen final 10-20 μ L complementado con H₂O o TE. La mezcla de reacción se incubó a 8-12°C durante 12-24 horas.

11.6 HIBRIDACION DE ADN

La técnica utilizada es la descrita en "Current protocols in molecular biology" (Ausubel *et al.*, 1990).

11.6.1. Transferencia de ADN

A. Por Capilaridad

Los fragmentos de ADN procedentes de la restricción de 1-5 μg de ADN cromosómico o plasmídico y separados por electroforesis en geles de agarosa, se transfirieron a membranas de nylon de 0,45 μm de diámetro de poro cargadas positivamente (Boehringer Mannheim, ref 1417240), siguiendo el protocolo de transferencia alcalina descrito por Reed y Mann (1985).

El gel se sumergió en HCl 0,25 M durante aproximadamente 15 minutos, este tratamiento ácido permite introducir mellas en el ADN y depurarlo, lo que facilita su posterior transferencia. Posteriormente el ADN se desnaturalizó introduciendo el gel en una solución de NaOH 0,5 M durante 15 minutos. La transferencia por capilaridad del ADN desnaturalizado se realizó en esta misma solución. Se colocó una tira de papel Whatman 3MM sobre un cristal de ancho similar al del gel y con los extremos sumergidos en un reservorio inferior con solución de transferencia. Sobre ella se colocó el gel en posición invertida, sobre éste la membrana y, por ultimo, se colocó abundante papel absorbente con 0,25-0,5 kg de peso distribuido uniformemente. La transferencia se realizó durante 15-20 horas y una vez finalizada, la membrana se lavó en 2xSSC durante 5 minutos. El ADN se fijó a la membrana mediante incubación a 80°C durante 60 minutos y posteriormente, se guardó en bolsas de plástico hasta su utilización.

B. Por vacío

Tiene el mismo fundamento que la técnica descrita en el apartado A, pero la transferencia de ADN del gel de agarosa a la membrana de nylon se realizó por aplicación de vacío, por medio del "VacuGene XL Vacuum blotting System" (Pharmacia, ref. 56-1130-80) según las indicaciones recomendadas por el fabricante.

11.6.2. Marcaje de ADN lineal

El marcaje de la sonda con digoxigenina y la detección de los híbridos ADN-ADN se llevó a cabo utilizando el kit de Boehringer Mannheim (ref. 1093657). Las sondas de ADN se marcaron con digoxigenina-dUTP, mediante extensión con el fragmento Klenow de la ADN-polimerasa de *E. coli* y utilizando como cebadores una mezcla aleatoria de hexanucleótidos. El marcaje de la sonda y su recuperación se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante.

11.6.3. Prehibridación e hibridación

Se utilizó un horno de hibridación (Techne Hybridiser HB-1D, Cambridge). Tras 2-8 horas de prehibridación a 42°C con la solución de hibridación, se retiró parcialmente la solución, manteniendo 2,5 mL/100 cm², se añadieron 20-200 ng de sonda marcada y desnaturalizada y posteriormente se realizó la hibridación durante 6-15 horas a 42°C. El lavado de las membranas se realizó en las siguientes condiciones de fuerza iónica y temperatura: dos lavados de 5 minutos cada uno a temperatura ambiente en 2xSSC y 0,1% (p/v) de SDS; dos lavados de 15 minutos cada uno a 68°C en 0,1xSSC y 0,1% (p/v) de SDS.

La composición de las soluciones utilizadas en este proceso son las siguientes:

Solución de hibridación: Tampón SSC, 5x; Formamida, 50% (v/v); SDS, 0,02% (p/v); Agente bloqueante, 5% (p/v); H₂O hasta 20 ml.

11.6.4. Reacción Inmunológica

Tras lavarse la membrana con solución tampón 1, se incubó en 100 mL de solución tampón 2 durante 30 minutos. A continuación se lavó con tampón 1 y se incubó con 20 mL de solución de anticuerpo diluido en tampón 1 durante 30 minutos. Posteriormente se realizaron dos lavados de 15 minutos con 100 mL de tampón para eliminar el anticuerpo no unido. La membrana fue entonces equilibrada con 20 mL de solución tampón 3 durante 2 minutos y a continuación incubada con 10 mL de la solución colorante durante 12-24 horas en oscuridad. La reacción se detuvo lavando con 50 mL de TE durante 5 minutos.

La composición de las soluciones utilizadas en este proceso fueron las siguientes:

Tampón 1, pH 7: Tris-HCl, 100 mM; NaCl, 150 mM.

Tampón 2: Bloqueante, 0,5% (p/v) en tampón 1.

Tampón 3, pH 9,5: Tris-HCl, 100 mM; NaCl, 100 mM; MgCl₂, 50 mM.

Solución de anticuerpo: Ab-digoxigenina, 4 µL; tampón 1 hasta 20 mL.

Solución colorante: NBT, 45 µL; X-fosfato, 35 µL; tampón 3 hasta 10 mL.

Tanto el bloqueante como la solución de NBT y X-fosfato fueron suministradas en el kit comercial de Boehringer Mannheim (ref. 1093657).

12. PREPARACION DE EXTRACTOS LIBRES DE CELULAS

Se partió de 50 mL de cultivo de las cepas en medio mínimo con nitrato como única fuente de nitrógeno y glicerol o sacarosa como únicas fuentes de carbono, incubados a 30°C con agitación. Una vez alcanzada la fase exponencial de crecimiento, las células se recogieron por centrifugación a 12000g durante 10 minutos a 4°C, se lavaron con tampón fosfato 100 mM, pH 7,2, y se resuspendieron en 5 mL del mismo tampón. La suspensión bacteriana se lisó por ultrasonidos utilizando un sonicador Braun Biotech modelo Labsonic 2000 con una sonda de tipo aguja, manteniendo la muestra en un baño de agua y hielo. Se dieron pulsos de 30 segundos a 75W, con intervalos de 1 minuto para evitar el calentamiento de la muestra, hasta que se obtuvo un extracto transparente. Los restos celulares se eliminaron por centrifugación a 10000g durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante constituyó el extracto libre de células utilizado para los ensayos enzimáticos.

13. MEDIDA DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS

13.1. ENSAYO DE LA ACTIVIDAD NITRITO REDUCTASA EN *KLEBSIELLA OXYTOCA* CECT 4460

La actividad nitrito reductasa en células de *Klebsiella oxytoca* se determinó tanto *in situ*, en células permeabilizadas con Tritón X-100, como en extractos libres de células preparados como se describe en el apartado 12 de Materiales y Métodos.

13.1.1. Ensayos *in situ*

Las células se recogieron por centrifugación a 12000g durante 5 minutos, se lavaron 2 veces con solución tampón fosfato 100 mM, pH 7,2, y se resuspendieron en 0,9 mL de la mezcla de ensayo (ver abajo composición), añadiéndose 10-15 μ L de Triton X-100 (25%, v/v), para conseguir su permeabilización durante 10 minutos a 4°C.

A la suspensión anterior se le añadió 0,1 mL del agente reductor ditionito sódico (160 mg mL⁻¹), para iniciar la reacción. La mezcla de reacción se incubó a 30°C durante 30 minutos, y a intervalos de 10 minutos se tomaron alícuotas de la misma, que tras ser diluidas 50 veces en H₂O, se agitaron vigorosamente para detener la reacción. Después de la eliminación de las células por centrifugación a 12000g durante 3 minutos, la concentración de nitrito en las alícuotas tomadas se determinó como se describe en el apartado 14.2. de esta sección.

Una unidad de actividad enzimática nitrito reductasa corresponde a la reducción de 1 μmol de nitrito por minuto.

La composición de la mezcla de ensayo fue la siguiente: Tampón fosfato potásico pH 7,2, 100 mM; NAD^+ , 1 mM; NaNO_2 , 1 mM y Metil viológeno, 0,9 mM como donador artificial de electrones

13.1.2. Ensayos *in vitro*

La actividad nitrito reductasa en extractos libres de células se determinó básicamente por el método de Coleman *et al.*, (1978). El ensayo se llevó a cabo en cubetas abiertas de 1 mL conteniendo la mezcla de ensayo, que se componía de: extracto celular, 50 μL ; NAD^+ , 1 mM; NADH , 0,375 mM; tampón fosfato potásico, pH 7,2, 100mM, hasta 0,9 mL.

A la mezcla de ensayo se le añadió finalmente 0,1 mL de NaNO_2 (a una concentración final en la mezcla de ensayo de 0,25 mM) para iniciar la reacción. La actividad nitrito reductasa se determinó espectrofotométricamente a 240 nm determinando la tasa de oxidación del NADH en presencia y ausencia de nitrito.

13.2. ENSAYO DE LA ACTIVIDAD NITRATO REDUCTASA EN *KLEBSIELLA OXYTOCA* CECT4460

La actividad nitrato reductasa en células de *Klebsiella oxytoca* se determinó tanto *in situ* en células permeabilizadas con Tritón X-100, como en extractos libres de células realizados como se describe en el apartado 12 de Materiales y Métodos.

13.2.1. Ensayos *in situ*

El ensayo de nitrato reductasa en células permeabilizadas se llevó a cabo de forma similar al ensayo de nitrito reductasa, excepto que la mezcla de reacción no contenía NAD^+ , y 5 mM de KNO_3 fue añadido en lugar de nitrito.

Una unidad de actividad enzimática nitrato reductasa corresponde a la producción de 1 μmol de nitrito por minuto.

13.2.2. Ensayos *in vitro*

La actividad nitrato reductasa en extractos libres de células se determinó de forma similar al ensayo de nitrito reductasa, excepto que la mezcla de reacción no contenía NAD^+ , y se añadió 5 mM de KNO_3 en lugar de nitrito para iniciar la reacción.

13.3. ENSAYO DE LA ACTIVIDAD NITRATO REDUCTASA EN *ARTHROBACTER GLOBIFORMIS* CECT 4500

La actividad nitrato reductasa en células de *Arthrobacter globiformis* se determinó *in situ* en células permeabilizadas con bromuro de alquiltrimetilamonio (MATAB).

Cultivos de *A. globiformis* conteniendo 95-175 μg de proteína total se centrifugaron a 12000g durante 1 minuto y se resuspendieron a la misma densidad en tampón MOPS, (pH, 7,0) suplementado con 2 mg mL^{-1} de MATAB. Después de incubarse durante 30 minutos a 4°C, las células mostraron máxima permeabilización. La actividad nitrato reductasa se ensayó en tampón MOPS básicamente por el método descrito por Manzano *et al.*, (1976).

Una unidad de actividad enzimática nitrato reductasa corresponde a la producción de 1 μmol de nitrito por minuto.

14. METODOS ANALITICOS

Los compuestos presentes en el medio de cultivo se analizaron tras la separación de las células mediante centrifugación en una centrífuga Sorvall R5C a 12000g durante 10-15 minutos. El sobrenadante se recogió en tubos estériles y se congeló a -20°C hasta su utilización.

14.1. DETERMINACION DE NITRATO

Para la determinación de nitrato se utilizó un electrodo ión selectivo de nitrato de la casa comercial Crison (micropH 2002). A 5 mL de sobrenadante se le añadió H_2O destilada hasta completar 50 mL, añadiéndose a continuación 1 mL de sulfato de aluminio (0,9 M) para minimizar interferencias por otros iones. La conductividad de la muestra se determinó utilizando un electrodo selectivo de nitrato y un potenciómetro. La concentración de nitrato en la muestra se estimó mediante la interpolación del valor obtenido en una recta de calibrado obtenida con distintas concentraciones de nitrato (entre 10^{-4} - 10^{-1} M).

Cuando se indica, la determinación de nitrato se realizó espectrofotométricamente mediante la utilización del kit comercial "Spectroquant" (ref. 14773) suministrado por la casa Merck (Darmstadt, Alemania) bajo las condiciones recomendadas por el fabricante.

14.2. DETERMINACION DE NITRITO

La determinación de nitrito se llevó a cabo mediante el método de diazotación de Snell y Snell, (1949). El producto que se forma, 1-naftilamina, es un compuesto coloreado cuya concentración en el medio se determinó espectrofotométricamente. Las soluciones utilizadas en este método se describen al final del apartado.

A 0.5 mL de sobrenadante se adicionaron volúmenes iguales de las soluciones de sulfanilamida y ácido N-naftil-etilen-diamino (NNEDA). Las muestras se agitaron y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos. Posteriormente se determinó la absorbancia de éstas a 540 nm.

Como patrón se utilizaron soluciones seriadas de nitrito sódico 5 mM, y la concentración de nitrito de las muestras problema se obtuvo por interpolación gráfica en curvas de A_{540} frente a las concentraciones de nitrito de la curva patrón.

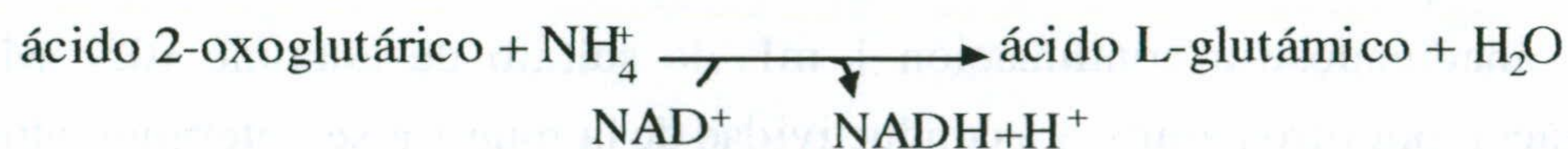
Las soluciones empleadas en este sistema son estables en la oscuridad y sus composiciones fueron las siguientes:

Solución de sulfanilamida: Sulfanilamida, 10 g; HCl 12 N, 200 ml; H₂O, hasta 1 L.

Solución NNEDA: NNEDA, 200 mg; H₂O, hasta 1 L.

14.3. DETERMINACION DE AMONIO

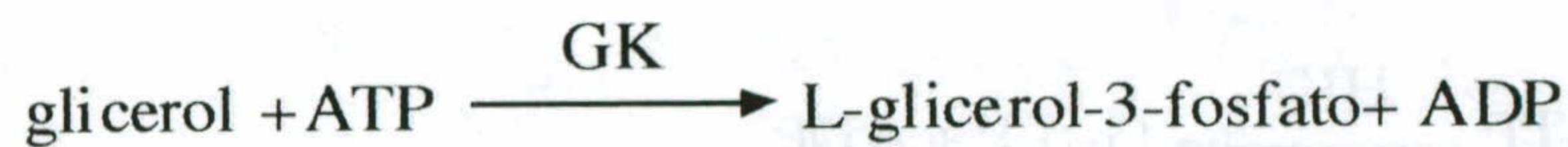
La medida de amonio se realizó utilizando el sistema para determinación de amonio suministrado por la casa comercial Boehringer Mannheim (ref. 1-112-732). Este método se basa en que la glutámico deshidrogenasa (GDH), cataliza la síntesis de glutámico a partir de amonio y ácido 2-oxoglutámico, con la concomitante reducción de NAD⁺ a NADH:



La cantidad de NAD⁺ que se reduce en esta reacción es estequiométricamente igual a la cantidad de amonio presente en la muestra. La concentración de NADH se determinó espectrofotométricamente midiendo su absorbancia a 340 nm y utilizando un coeficiente de extinción molar para el NADH de 6,3 (L x mmol⁻¹ x cm⁻¹).

14.4. DETERMINACION DE GLICEROL

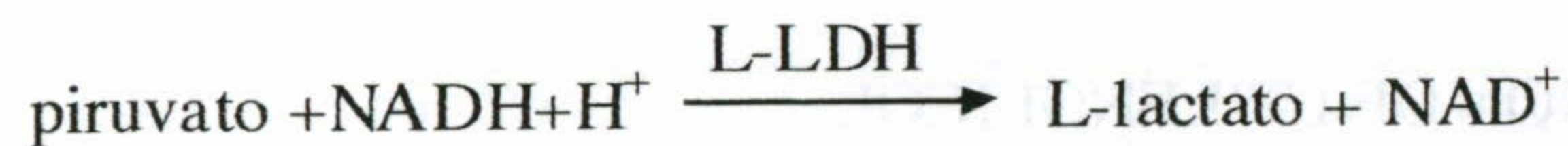
El glicerol presente en las muestras se determinó enzimáticamente mediante la utilización de un kit comercial suministrado por Boehringer Mannheim (ref. 148270). Este método se basa en la fosforilación del glicerol por la acción del adenosin-5'-trifosfato (ATP) para dar L-glicerol-3-fosfato, en una reacción catalizada por la glicerokinasa (GK):



El adenosin-5'-difosfato (ADP) formado en la reacción anterior es fosforilado a ATP en una reacción dependiente de fosfoenolpiruvato (PEP) y catalizado por la piruvato kinasa (PK), que rinde piruvato:



La lactato deshidrogenasa (L-LDH), cataliza la reducción de piruvato a L-lactato en una reacción en la que el NADH se oxida a NAD⁺:



La cantidad de NADH que se oxida en esta reacción es estequiométricamente igual a la cantidad de glicerol presente en la muestra. La concentración de NADH se determinó espectrofotométricamente midiendo su absorvancia a 340 nm y utilizando un coeficiente de extinción molar para el NADH de 6,3 (L x mmol⁻¹ x cm⁻¹).

14.5. DETERMINACION DE SACAROSA

La sacarosa presente en las muestras se determinó enzimáticamente mediante la utilización de un kit comercial suministrado por Boehringer Mannheim (ref. 139041). Este método se basa en la hidrólisis de la sacarosa a pH 4,6 por acción de la enzima β-fructosidasa (invertasa) para rendir D-glucosa y D-fructosa:



La determinación de D-glucosa después de la inversión (glucosa total) es llevada a cabo simultáneamente de acuerdo con el siguiente principio.

A pH 7,6 la D-glucosa es fosforilada por acción del ATP en una reacción catalizada por la enzima hexokinasa (HK) con la consiguiente formación de ADP:



La glucosa-6-fosfato (G-6-P) es oxidada a gluconato-6-fosfato con NADP^+ como aceptor de electrones en una reacción catalizada por la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (G6P-DH):



La concentración de NADPH que se produce en esta serie de reacciones es estequiométricamente igual a la concentración de D-glucosa presente en la muestra. La cantidad de NADPH se determinó espectrofotométricamente midiendo su absorbancia a 340 nm y utilizando un coeficiente de extinción molar para el NADH de $6,3(\text{L} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1})$.

14.6. DETERMINACION DE ETILENGLICOL

El etilenglicol presente en las muestras se determinó según el método descrito por Ramos *et al.*, (1996). Las muestras convenientemente diluidas se analizaron por cromatografía de gases con un detector FID (Fase estacionaria: FFAP-Quadrex; grosor, $0,25\mu\text{m}$; longitud, 25 m). La temperatura del inyector fue de 250°C , la temperatura en el horno fue de 110°C a 160°C con un incremento de 10°C por minuto, y la temperatura del detector se matuvo a 300°C . El tiempo de retención fue de 6,9 minutos.

14.7. DETERMINACION DEL CARBONO ORGANICO DISUELTO TOTAL (TOC)

El carbono orgánico total fue medido usando un analizador de gases TOC-UNOR (H. Maihak AG, Hamburg, Alemania). Las muestras se diluyeron, se acidificaron con HCl hasta alcanzar pH 3 y se burbujearon con N_2 para eliminar el carbono inorgánico presente en las mismas. Después de este tratamiento, las muestra se quemaron y volatilizaron a altas

temperaturas (catalizador de zinc). El CO₂ resultante fue medido mediante un analizador de gases (IR-spectrum) y monitorizado para la determinación del carbono orgánico total. El analizador fue previamente calibrado con concentraciones conocidas de carbono. El intervalo de medida fue de entre 0 y 100 mg L⁻¹.

14.8. DETERMINACION DE ACETATO

El acetato fue medido usando cromatografía de alta presión de exclusión de iones, según el método descrito por Bally (1994). El límite de detección fue 1 mg L⁻¹ de C-acetato.

14.9. DETERMINACION DE PROTEINAS

Un mL de suspensión celular se centrifugó durante 5 minutos a 12000g en una centrífuga de mesa, y el sedimento se resuspendió en 1 mL de ácido tricloroacético al 10% (p/v), preenfriado a 2°C, centrifugándose de nuevo después de 10 minutos en frío y repitiéndose esta operación dos veces. El sedimento resultante se resuspendió en 1 mL de agua destilada, utilizándose una alícuota para determinar la concentración de proteína por el método de Bradford, con reactivos suministrados por la casa comercial Bio-Rad (Bio-Rad Dye reagent concentrate, ref. 500-0006), utilizando albúmina bovina como patrón.

14.10. DETERMINACION DEL CONTENIDO EN C Y N EN LA BIOMASA

El contenido en C y N de la biomasa se determinó utilizando un analizador elemental de C, H, N y S (Carlo Erba, EA1108), según las instrucciones suministradas por el fabricante.

15. MICROSCOPIA ELECTRONICA

A. globiformis CECT 4500 y *K. oxytoca* CECT 4460 se cultivaron en medio rico LB o en medio mínimo con una concentración inicial de nitrato de 20 y 100 mM a 30°C y con agitación durante 12-24 horas. Las células se recogieron por centrifugación a 12000g, y fueron inmediatamente fijadas con una solución de glutaraldehído, 2% (v/v) y formaldehído, 1% (v/v). Las muestras fueron preparadas y examinadas en los Servicios Técnicos de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada de la siguiente forma, la preparación fue postfijada con tetróxido de osmio en presencia de 2% (p/v) de ferrocianida potásica, e introducidas en una resina de Eponato 12. Las muestras se cortaron en secciones finas que fueron posteriormente

teñidas con acetato de uranilo y citrato de plomo, y finalmente examinadas en un microscópio de transmisión electrónico con un voltaje de aceleración de 75 kV.

RESULTADOS



I. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE BACTERIAS TOLERANTES A ALTAS CONCENTRACIONES DE NITRATO

Resumen

Dos microorganismos, una bacteria gram-negativa identificada como *Klebsiella oxytoca*, y otra gram-positiva identificada como *Arthrobacter globiformis*, tolerantes a concentraciones de al menos 1M de nitrato, fueron aislados de los suelos de la fábrica de Unión Española de Explosivos en el Paramo de Masa, en Quintanilla de Sobresierra (Burgos). Ambas cepas fueron depositadas en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) bajo el número de acceso CECT 4460 y CECT 4500 respectivamente. Estas bacterias, en condiciones de aerobiosis, fueron capaces de utilizar una gran variedad de sustratos como fuente de carbono para la obtención de la energía requerida para el crecimiento, el cual tuvo lugar cuando la concentración de nitrato en el medio de cultivo fue inferior a 150 mM. En este capítulo se describe el aislamiento y caracterización de ambas cepas, así como la optimización en el laboratorio del proceso de eliminación de nitrato en aguas residuales procedentes de la fabricación de DNEG por estas cepas.

1. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE BACTERIAS TOLERANTES A ALTAS CONCENTRACIONES DE NITRATO Y CAPACES DE UTILIZAR ESTE COMO UNICA FUENTE DE NITROGENO

Estudios previos de este grupo de investigación revelaron que los organismos presentes en suelos agrícolas, y en plantas de tratamiento de aguas residuales urbanas, eran sensibles a altas concentraciones de nitrato. Por el contrario, entre los microorganismos presentes en los suelos de una fabrica de explosivos, se encontraban organismos tolerantes a altas concentraciones de nitrato, y se vislumbró que podrían ser capaces de utilizar éste como única fuente de nitrógeno, ya que en el tratamiento de aguas residuales con DNEG no sólo se observó disminución de este nitroorgánico, sino también de nitrato (Ramos *et al.*, 1996).

Con objeto de aislar y caracterizar dichos microorganismos, en la fábrica de Paramo de Masa (Burgos) se aró y regó una zona de aproximadamente 500 m² alrededor del punto de vertido de las aguas residuales procedentes de la fabricación de DNEG. Estas aguas son vertidas a través de un canal denominado "Canal V" independiente del resto de las líneas de vertido de la fábrica.

Alrededor de la zona de vertido, se tomaron muestras de suelos de seis puntos distintos y a distinta profundidad. Diez gramos de suelo de cada muestra se utilizaron para enriquecer en microorganismos que fueran capaces de utilizar nitrato como única fuente de nitrógeno y glicerol o ETG como única fuente de carbono. La elección de estas fuentes de carbono se basó en que ambos compuestos son utilizados como materia prima para la fabricación de explosivos en la fábrica.

Además, se recogieron aguas del Canal V, en un punto en el cual ya se había procedido a la neutralización de las mismas, para su utilización como fuente de N en la serie de enriquecimientos previstos.

1.1. ENRIQUECIMIENTO DE MICROORGANISMOS QUE UTILIZAN NO₃⁻ COMO FUENTE DE NITROGENO

1.1.1. Con glicerol como única fuente de carbono

Diez g de muestras de suelos se suspendieron en medio mínimo sin fuente de carbono ni de nitrógeno, y se suplementaron con aguas del Canal V diluidas 1/2, 1/4 y 1/8 en presencia y ausencia de 10 g L⁻¹ de glicerol. Trás 1 semana de incubación a 30°C se procedió a sembrar los microorganismos en placas de medio mínimo suplementadas con 40 mM de NO₃⁻ y 20 g L⁻¹ de glicerol. A las 24, 48 y 72 horas se seleccionaron colonias morfológicamente distintas, obteniéndose 34 tipos celulares distintos. Entonces se procedió

a la purificación de los mismos en el mismo medio, observándose que solo quince clones crecían rápidamente (menos de 24 horas) en placas con glicerol y KNO_3 .

Para seleccionar la(s) mejor(es) cepa(s) se sometieron a una serie de ensayos de crecimiento a distintas concentraciones de glicerol y KNO_3 . A cualquier concentración de nitrato (10-100 mM) y a cualquier concentración de glicerol (2-20 g L^{-1}), la cepa denominada CECT 4460 mostró el mejor crecimiento (menor tiempo de generación y mayor eliminación de nitrato), siendo elegida para su posterior estudio.

1.1.2. Con ETG como única fuente de carbono

Estos enriquecimientos se llevaron a cabo de la misma forma que en el apartado anterior, excepto que se utilizó ETG como única fuente de carbono. Trás 1 semana de incubación a 30°C se procedió a sembrar los microorganismos presentes en los enriquecimientos en placas de medio mínimo suplementadas con 40 mM de NO_3^- y 20 g L^{-1} de ETG. Posteriormente, se seleccionaron colonias morfológicamente distintas, obteniéndose 6 tipos celulares. Entonces se procedió a la purificación de los mismos en el mismo medio, observándose que solo uno de ellos crecía rápidamente (menos de 24 horas) en placas con ETG y KNO_3 . Esta cepa se denominó CECT 4500 y se eligió para posteriores análisis.

1.2. CARACTERIZACION DE LAS CEPAS SELECCIONADAS

Las cepas previamente seleccionadas de los enriquecimientos llevados a cabo en glicerol y ETG, denominadas CECT 4460 y CECT 4500 respectivamente, se sometieron a tinción de Gram y a los ensayos metabólicos disponibles en el paquete comercial API (ver Materiales y Métodos), revelando que la cepa denominada CECT 4460 era una bacteria gram-negativa perteneciente al género *Klebsiella*, y la cepa CECT 4500 era una bacteria gram-positiva perteneciente al género *Arthrobacter*. Ambas cepas fueron oxidasa-negativa.

Análisis del perfil de fosfolípidos identificaron a la cepa CECT 4460 como *Klebsiella oxytoca* y a la cepa CECT 4500 como *Arthrobacter globiformis*. El patrón de fosfolípidos permaneció inalterable independientemente de la concentración de nitrato utilizada para su cultivo.

Klebsiella oxytoca CECT 4460 fue capaz de crecer tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas, mientras que *A. globiformis* CECT 4500 resultó ser una bacteria aerobia estricta.

Para determinar la susceptibilidad de estos clones a antibióticos, se realizó un antibiograma de ambas cepas en medio LB sólido, suministrándose los antibióticos a la concentración ($\mu\text{g mL}^{-1}$) indicada entre parentesis. Ambos clones fueron sensibles a rifampicina (10), cloranfenicol (30), espectinomicina (20), estreptomycin (25) y tetraciclina

(10). *K. oxytoca* CECT 4460 presentó resistencia natural a ácido nalidíxico (10) y ampicilina (25), y *A. globiformis* CECT 4500 presentó resistencia natural a ácido nalidíxico (10) y kanamicina (20).

Las dos cepas mostraron similitudes y diferencias en cuanto a los sustratos que fueron capaces de utilizar como única fuente de carbono y energía. Ambas cepas utilizaron glicerol, glucosa, fructosa, sacarosa, galactosa y lactosa. *Arthrobacter globiformis* CECT 4500 además de estos sustratos, fue capaz de utilizar como fuentes de carbono etilenglicol, ácido acético y formaldehído. Como fuente de nitrógeno, ambas fueron capaces de utilizar nitrato y amonio, siendo además *A. globiformis* CECT 4500 capaz de utilizar urea.

1.3. ULTRAESTRUCTURA DE *KLEBSIELLA OXYTOCA* Y *ARTHROBACTER GLOBIFORMIS*

La ultraestructura de *K. oxytoca* y *A. globiformis* se estudió en células cultivadas en medio rico LB, y en medio mínimo con 20 mM de nitrato, con objeto de establecer posibles diferencias en cuanto a su morfología dependiendo de la existencia o no de nitrato en el medio de cultivo.

Klebsiella oxytoca CECT 4460 mostró diferencias significativas en su pared celular dependiendo de la presencia o ausencia de nitrato en el medio de cultivo (Fig. 9). Cuando las células fueron cultivadas en ausencia de nitrato, la pared celular apareció delgada, uniforme y sin prolongaciones (Fig. 9A). Cuando las células se cultivaron en presencia de nitrato, la pared celular apareció engrosada, con ondulaciones y formando unas largas prolongaciones a modo de filamentos (Fig. 9B), también se observó que el citoplasma se hacía más denso al paso de los electrones.

Arthrobacter globiformis CECT 4500 mostró una ultraestructura típica de los miembros del género *Arthrobacter* (Fig. 10), y se observaron diferencias significativas dependiendo de la presencia o ausencia de nitrato en el medio de cultivo. Cuando las células fueron cultivadas en ausencia de nitrato, estas aparecían en forma de células aisladas o bien formando parejas (Fig. 10A). Cuando las células se cultivaron en presencia de nitrato, éstas aparecieron formando filamentos, generalmente de 4-5 células (Fig. 10B).

Análisis de microscopía electrónica a mayor aumento (63000x), revelaron que las células cultivadas en medio mínimo con nitrato, contenían cuerpos de inclusión en el citoplasma (Fig. 11), pero su naturaleza no se ha estudiado.

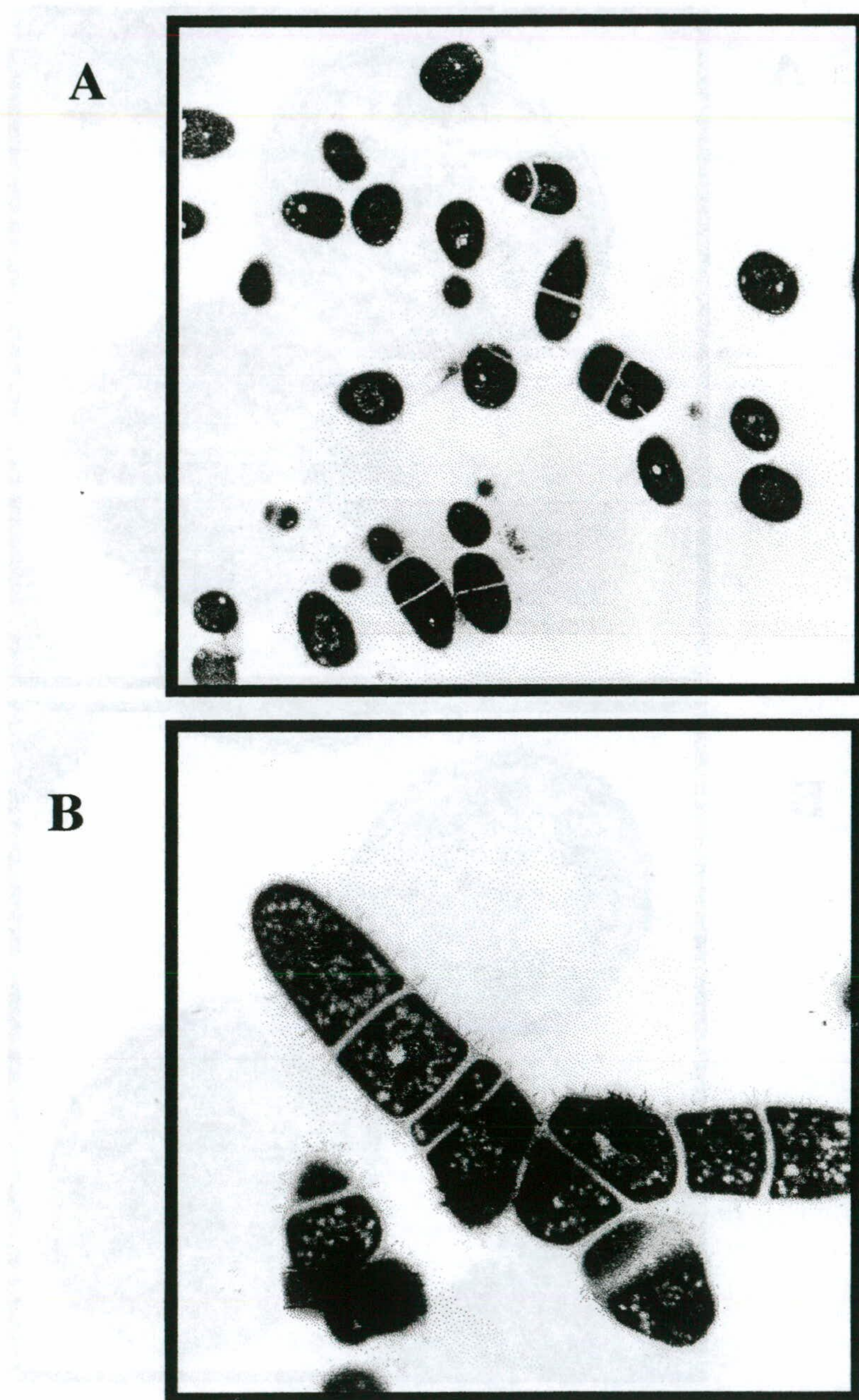
También se determinó la ultraestructura de ambas cepas utilizando una concentración de 100 mM de nitrato en el medio de cultivo, pero no se observó una diferencia significativa con respecto a la ultraestructura observada utilizando 20 mM de nitrato en el medio de cultivo (datos no mostrados).

Figura 9. Ultraestructura de *Klebsiella oxytoca* CECT 4460.



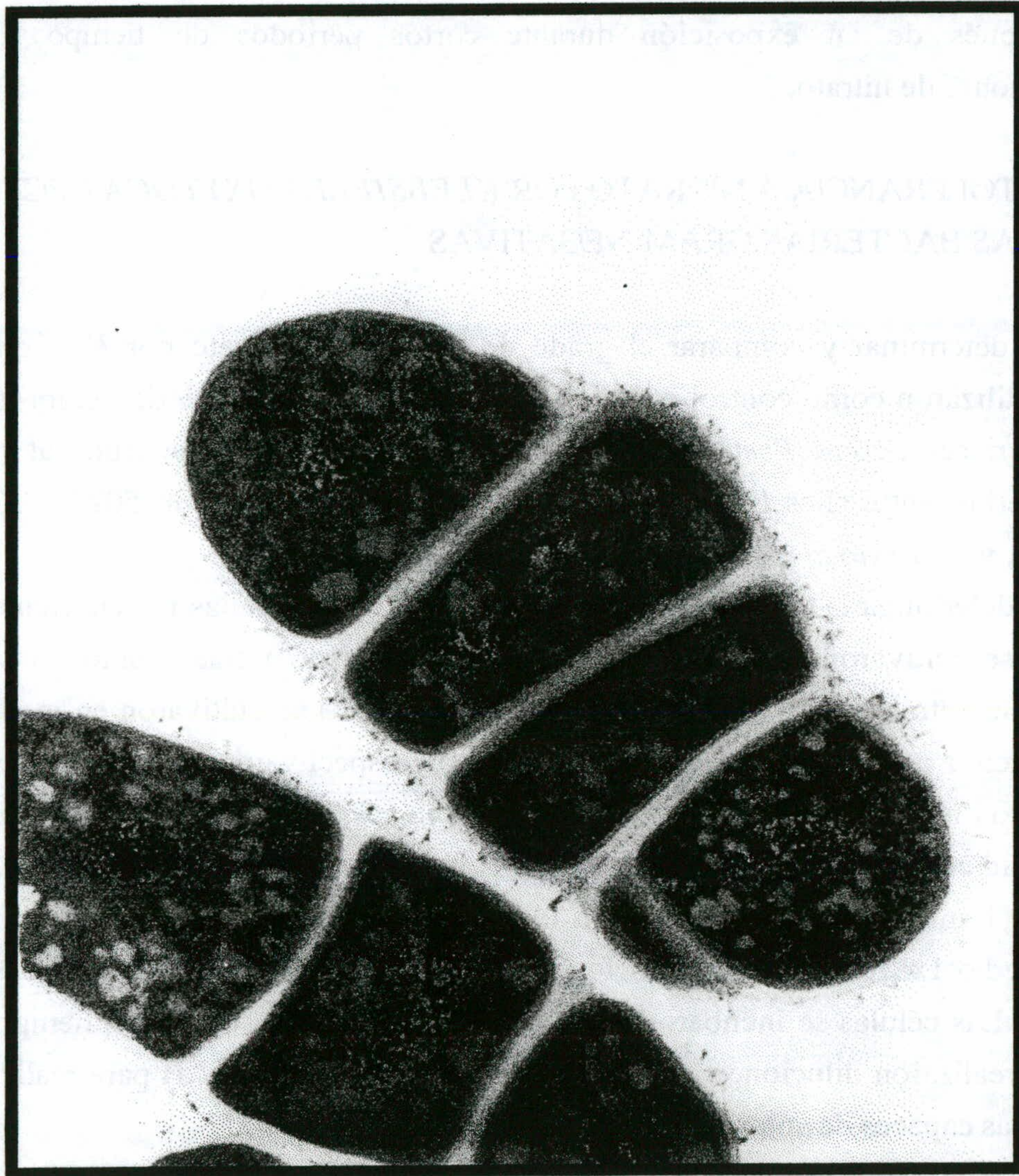
Klebsiella oxytoca CECT 4460 se cultivó en medio rico LB, en ausencia de nitrato (63000x) (A); y en medio mínimo con glicerol como fuente de carbono y nitrato, 20 mM (63000x) (B).

Figura 10. Ultraestructura de *Arthrobacter globiformis* CECT 4500.



Arthrobacter globiformis CECT 4500 se cultivó en medio rico LB, en ausencia de nitrato (10000x) (A); y medio mínimo con etilenglicol como fuente de carbono y nitrato, 20 mM (20000x) (B).

Figura 11. Ultraestructura de *Arthrobacter globiformis* CECT 4500 cultivada en presencia de 20 mM de nitrato.



Arthrobacter globiformis CECT 4500 se cultivó en medio mínimo con 20 mM de nitrato y etilenglicol como fuente de carbono hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento, entonces se prepararon muestras para su observación a microscopía electrónica según se indica en el apartado de Materiales y Métodos. Se utilizó un aumento de 63000x para la visualización de cuerpos de inclusión en el citoplasma.

2. *KLEBSIELLA OXYTOCA* CECT 4460 Y *ARTHROBACTER GLOBIFORMIS* CECT 4500 TOLERAN ALTAS CONCENTRACIONES DE NITRATO

Para determinar el grado de tolerancia a nitrato, y si esta característica era relevante únicamente en las cepas aisladas de los suelos de la fábrica antes mencionada, se investigó el nivel de tolerancia a nitrato de estas cepas, entendiendo ésta como la supervivencia de las cepas después de su exposición durante cortos periodos de tiempo a diferentes concentraciones de nitrato.

2.1. TOLERANCIA A NITRATO POR *KLEBSIELLA OXYTOCA* CECT 4460 Y OTRAS BACTERIAS GRAM-NEGATIVAS

Para determinar y comparar el grado de tolerancia a nitrato por *K. oxytoca* CECT 4460, se utilizaron como control en este ensayo un grupo de bacterias gram-negativas no enterobacteriaceas, como *Pseudomonas putida* 2440, y otras pertenecientes al grupo de las enterobacterias, entre ellas *Escherichia coli* ET8000, *K. pneumoniae* 50231, *K. planticola* CECT 843, y *K. oxytoca* CECT 860.

Para determinar la tolerancia a nitrato de estas cepas, aquellas pertenecientes al género *Klebsiella* se cultivaron en medio mínimo con 20 mM de nitrato como única fuente de nitrógeno, mientras que *P. putida* 2440 y *E. coli* ET8000 se cultivaron en medio rico LB, debido al lento o nulo crecimiento de estas cepas respectivamente en medio mínimo con nitrato como fuente de nitrógeno. El periodo de incubación fue de 12-16 horas hasta alcanzar una densidad celular de alrededor de 10^8 - 10^9 bacterias formadoras de colonias (CFU) mL⁻¹. Entonces 0,1 mL de cultivo fue transferido a 1 mL de una solución que contenía tampón fosfato (medio 1xM8) con concentraciones crecientes de nitrato, que fueron desde 20 mM hasta 1 M. Las células se incubaron a 30°C, y a diferentes intervalos de tiempo (3, 9 y 24 horas), se realizaron diluciones seriadas y siembras en placas de LB para realizar el conteo de las células capaces de sobrevivir a la exposición a nitrato.

A las 3 horas de incubación a 30°C se observó que *K. oxytoca* CECT 4460 toleraba concentraciones de hasta 1 M de nitrato sin una pérdida significativa de viabilidad. *K. pneumoniae* 50231 no fue capaz de tolerar concentraciones superiores a 250 mM de nitrato (Tabla 1), *K. planticola* CECT 843, *K. oxytoca* CECT 860, *E. coli* ET8000 y *P. putida* 2440 no toleraron concentraciones superiores a 100 mM (en la Tabla 7 se recogen los resultados obtenidos para *K. planticola*).

A las 24 horas de incubación, la supervivencia de *K. oxytoca* CECT 4460 en 0,5 M y 1 M de nitrato resultó ser del 85% y 40% de la población inicial respectivamente (datos no mostrados).

Estos resultados indican que *K. oxytoca* CECT 4460 no sólo toleró altas concentraciones de NO_3^- en el medio de cultivo, sino que fue más tolerante a la presencia de este ión que las cepas antes mencionadas.

Tabla 7. Tolerancia de *K. oxytoca* CECT 4460, *K. pneumoniae* 50231 y *K. planticola* CECT 843 a nitrato.

[Nitrato] (M)	<i>K. oxytoca</i> CECT 4460	<i>K. pneumoniae</i> 50231	<i>K. planticola</i> CECT 843
0	100	100	100
0,02	100	100	100
0,1	100	100	40
0,250	100	66	0,2
0,5	100	6	<0,01
1,0	100	3	<0,01

Alrededor de 10^8 CFU mL^{-1} de cada una de las cepas se incubaron en medio 1xM8 sin fuente de carbono, y a la concentración indicada de NO_3^- . A las 3 horas se realizaron diluciones seriadas y siembras en placa para determinar el número de CFU mL^{-1} . Los valores en la Tabla indican el porcentaje de supervivencia con respecto a la población inicial.

2.2. TOLERANCIA A NITRATO POR *ARTHROBACTER GLOBIFORMIS* CECT 4500 Y OTRAS BACTERIAS GRAM-POSITIVAS

Para determinar y comparar el grado de tolerancia a nitrato de *A. globiformis* CECT 4500, se utilizaron como control en este ensayo una cepa de *Bacillus subtilis* y la cepa *Arthrobacter globiformis* CECT 388. Estas cepas eran capaces de formar colonias en medio mínimo con nitrato como única fuente de nitrógeno, pero no eran capaces de utilizar ETG como única fuente de carbono, por lo que se cultivaron utilizando glicerol o glucosa como única fuente de carbono.

El ensayo se llevó a cabo de la misma forma que en el apartado anterior. A las 3 horas de incubación a 30°C se observó que *A. globiformis* CECT 4500 toleraba concentraciones de hasta 1 M de nitrato sin una pérdida significativa de viabilidad, mientras que la viabilidad de *B. subtilis* y *A. globiformis* CECT 388 se vió notablemente disminuida, no siendo capaces de tolerar concentraciones superiores a 250 mM de nitrato (Tabla 8).

B. subtilis resultó ser más sensible a nitrato que las cepas pertenecientes al género *Arthrobacter*; a concentración 100 mM de NO_3^- en la solución de incubación se observó una pérdida del 95% de la viabilidad con respecto a la población inicial.

A las 24 horas de incubación, la supervivencia de *A. globiformis* CECT 4500 en 1 M de nitrato continuó siendo del 100%, mientras que para las cepas control ésta fue tan sólo de un 6% en el caso de *A. globiformis* CECT 388 y por debajo del 0,02% en el caso de *B. subtilis*.

Tabla 8. Tolerancia de *A. globiformis* CECT 4500, *A. globiformis* CECT 388, y *B. subtilis* a nitrato.

[Nitrato] (M)	<i>A. globiformis</i> CECT 4500	<i>A. globiformis</i> CECT 388	<i>B. subtilis</i>
0	100	100	100
0,02	100	100	60
0,1	100	100	6
0,250	100	100	3
0,5	100	20	0,3
1,0	100	10	0,3

Las condiciones de ensayo y conteo son las indicadas en la Tabla 7, excepto que se utilizaron las cepas aquí indicadas.

3. OPTIMIZACION DE LAS CONDICIONES DE CRECIMIENTO EN CULTIVOS ESTANCOS EN FERMENTADORES DE 2 L

En este apartado se detalla la puesta a punto de las condiciones operacionales en fermentadores de 2 L, bajo condiciones de laboratorio, para la eliminación del nitrato presente en las aguas residuales procedentes de la nitración de etilenglicol. Los parámetros que se estudiaron fueron agitación, temperatura y pH.

La aireación se mantuvo en todos los casos constante a una tasa de 1 L de aire por L de medio de cultivo por minuto, salvo en los experimentos realizados en condiciones de anaerobiosis, en los cuales se suprimió la aireación.

El medio de cultivo utilizado fue el standard descrito en el apartado de Materiales y Métodos para los cultivos estancos, utilizando como fuente de nitrógeno el nitrato presente en las aguas del "Canal V" convenientemente diluidas para obtener una concentración inicial

de 20 mM. Como fuente de carbono, se utilizó glicerol en el caso de *K. oxytoca* CECT 4460 y etilenglicol en el caso de *A. globiformis* CECT 4500, a una concentración final en el medio de cultivo de 10 g L⁻¹.

3.1. OPTIMIZACION DE LAS CONDICIONES DE CRECIMIENTO PARA *KLEBSIELLA OXYTOCA* CECT 4460

Klebsiella oxytoca CECT 4460 fue capaz de crecer con nitrato como única fuente de nitrógeno y glicerol como única fuente de carbono tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas. En este apartado se estudió el crecimiento de *K. oxytoca* CECT 4460 en ambas condiciones y con diferentes condiciones generales de operación en el fermentador.

Una vez esterilizado y preparado el fermentador de 2 L, se fijaron automáticamente todas las condiciones operacionales deseadas de pH, temperatura y agitación. Posteriormente el medio de cultivo estéril fue inoculado con células de la cepa *K. oxytoca* CECT 4460 precultivadas en aerobiosis en el mismo medio de cultivo, para alcanzar una densidad celular inicial de 0,03-0,08 unidades a 660 nm.

3.1.1. Efecto de la agitación sobre el crecimiento de *K. oxytoca* CECT 4460

Para la realización de esta batería de experimentos, la temperatura de trabajo se mantuvo constante a 30°C mediante un sistema de doble camisa del fermentador, y el pH se mantuvo constante a 7±0,1 mediante la adición automática de NaOH, 2 N y H₂SO₄, 1 N al medio de cultivo a través de bombas peristálticas.

La agitación (sistema rotacional) se ensayó en un intervalo comprendido entre 200 y 1000 rpm, manteniéndose ésta constante en cada ensayo.

3.1.1.1. Ensayos en condiciones anaeróbicas

El periodo de incubación para los ensayos llevados a cabo en anaerobiosis fue de 48 horas, tomándose muestras de los cultivos a lo largo del tiempo para la determinación del crecimiento bacteriano, concentración de nitrato, nitrito y glicerol. Al final de cada experiencia se determinó el peso seco del cultivo para la determinación del rendimiento del cultivo. Los resultados finales obtenidos en esta batería de experimentos se resumen en la Tabla 9. En todos los casos se observó acumulación transitoria de nitrito, con concentraciones entre 20-80 μM a las 7 horas de iniciado el cultivo (datos no mostrados). Posteriormente el nitrito desapareció y no se volvió a detectar en el medio de cultivo, excepto a la agitación más baja que se mantuvo en 6 μM a las 48 horas. Independientemente de la velocidad de agitación se consumió más del 90% del nitrato inicial, llegando a ser superior al

99% cuando la agitación fue superior a 400 rpm. Asimismo, a agitación superior a 400 rpm se observó el consumo de más del 95% del glicerol inicial suministrado al cultivo.

En la Figura 12A se observa el efecto de la agitación sobre el crecimiento a lo largo del tiempo de *K. oxytoca* CECT 4460 en anaerobiosis. El mayor crecimiento se obtuvo a 600 rpm, alcanzando una densidad celular máxima, medida a 660nm, de 4 unidades. La densidad celular alcanzada a 800 y 1000 rpm fue similar (entre 2,5 y 3 unidades de densidad óptica), pero la fase de latencia que precedía al crecimiento exponencial fue mayor a 800 rpm (6 horas), que a 1000 rpm (2 horas). A 200 y 400 rpm, las densidades celulares que se alcanzaron fueron 0,65 y 2 unidades respectivamente, siendo éstas 7,5 y 2 veces inferior a la alcanzada a 600 rpm respectivamente. En concordancia con estos datos el mayor rendimiento, medido como biomasa (g L^{-1}) se obtuvo a 600 rpm.

Tabla 9. Efecto de la agitación sobre el crecimiento de *Klebsiella oxytoca* CECT 4460 en condiciones de anaerobiosis.

Agitación	Nitrato (mM)	Nitrito (mM)	Glicerol (g L^{-1})	Peso seco (g L^{-1})
200	0,820	0,006	4	2,3
400	<0,150	0	0,1	2,7
600	<0,150	0	0	3,6
800	<0,150	0	0,2	2,9
1000	<0,150	0	0,4	3,1

Klebsiella oxytoca CECT 4460 se cultivó en medio mínimo con 20 mM de KNO_3 hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento tardía, entonces una alícuota del cultivo se transfirió al fermentador de 2 L para alcanzar una densidad celular inicial de 0,03-0,08. Se utilizó medio mínimo con agua del Canal V diluida para alcanzar una concentración de 20 mM de nitrato. La temperatura se mantuvo constante a 30°C y el pH a $7,0 \pm 0,1$ mediante al adición de NaOH, 2 N y H_2SO_4 , 1 N y no se suministró aire. La agitación (rpm) ensayada se mantuvo constante durante las 48 horas del experimento, especificándose ésta en la columna de la izquierda. Los valores de nitrato (mM), nitrito (mM), glicerol (g L^{-1}) y peso seco (g L^{-1}) se determinaron al final del ensayo (48 horas).

3.1.1.2. Ensayos en condiciones aeróbicas

El periodo de incubación, al igual que para los ensayos llevados a cabo en anaerobiosis fue de 48 horas, tomándose muestras de los cultivos a lo largo del tiempo para la determinación del crecimiento bacteriano, concentración de nitrato, nitrito y glicerol. Al final de cada experiencia se determinó el peso seco del cultivo para estimar el rendimiento del

cultivo. Los resultados finales obtenidos en esta batería de experimentos se resumen en la Tabla 10. A las 24 horas de iniciados los cultivos, el nitrato desapareció en todos los casos, pero a este tiempo se observó una acumulación transitoria de nitrito, que fue más alta cuanto más baja fue la agitación (datos no mostrados). Independientemente de la velocidad de agitación se consumió más del 99% del nitrato inicial, asimismo en todos los casos se observó el consumo total del glicerol inicial suministrado al cultivo.

En la Figura 12B se presenta el efecto de la agitación sobre el crecimiento de *K. oxytoca* CECT 4460 en aerobiosis. Al igual que en condiciones de anaerobiosis, el mayor crecimiento, determinado como turbidez a 660 nm, se obtuvo a 600 rpm, alcanzando una densidad celular de 7,3 unidades a las 24 horas de iniciado el ensayo. A 800 rpm y 1000 rpm, las curvas de crecimiento obtenidas fueron muy similares a la obtenida a 600 rpm. A 200 rpm y 400 rpm las curvas de crecimiento también siguieron un comportamiento similar, alcanzándose un máximo de 2,5-2,8 unidades de turbidez a 660 nm a las 24 horas de inicio del experimento. Estos valores fueron 2,5 veces inferiores a los obtenidos con una agitación ≥ 600 rpm. En concordancia con estos datos el mayor rendimiento medido como biomasa (g L^{-1}) se obtuvo a 600 rpm.

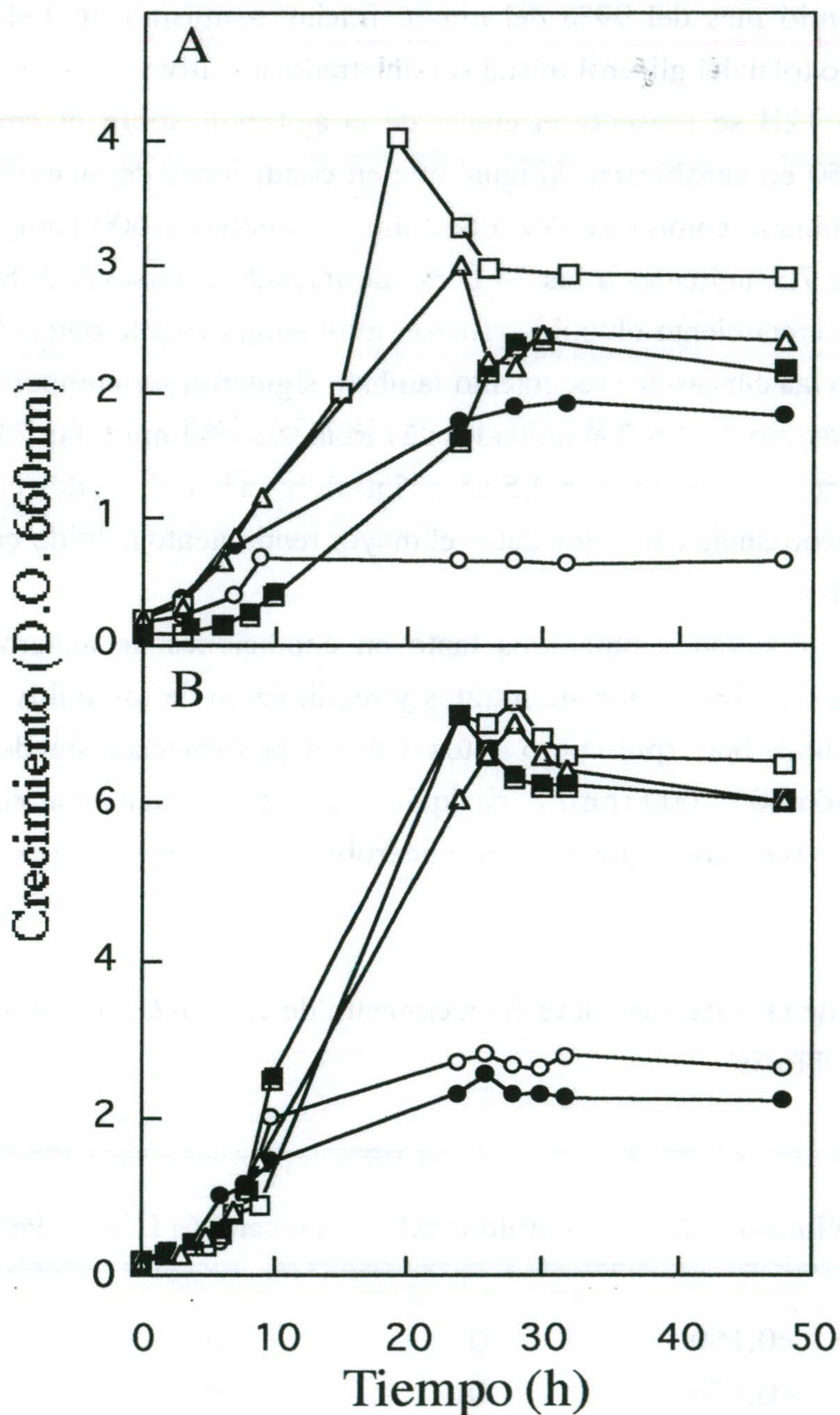
En base a los resultados obtenidos tanto en condiciones de anaerobiosis como de aerobiosis, en cuanto a eliminación de nitratos y rendimiento de los cultivos, se estableció como agitación óptima 600 rpm, pero estos valores permanecían siendo óptimos en el intervalo de agitación 400-1000 rpm. A cualquier velocidad de agitación el rendimiento de los cultivos aerobios fue mayor que el de los anaerobios, como fue de esperar.

Tabla 10. Efecto de la agitación sobre el crecimiento de *Klebsiella oxytoca* CECT 4460 en condiciones de aerobiosis.

Agitación	Nitrato (mM)	Nitrito (mM)	Glicerol (g L^{-1})	Peso seco (g L^{-1})
200	<0,150	0	0	3,2
400	<0,150	0	0	3
600	<0,150	0,005	0,04	4,7
800	<0,150	0,014	0	4,5
1000	0,330	0,013	0	4,6

Las condiciones de cultivo y ensayo son las detalladas en la leyenda de la Tabla 9, excepto que los cultivos se airearon con una tasa de 1 L de aire por L de cultivo por minuto.

Figura 12. Crecimiento de *Klebsiella oxytoca* CECT 4460 en un fermentador de 2 L a distintas velocidades de agitación en condiciones anaeróbicas y aeróbicas.



Las condiciones de cultivo y ensayo son las expuestas en la leyenda de la Tabla 9. El panel A muestra los resultados de los cultivos mantenidos en anaerobiosis, mientras que el panel B fueron cultivos mantenidos en aerobiosis. A los tiempos indicados se determinó la turbidez del cultivo ($D.O_{660}$) de *K. oxytoca* CECT 4460. La velocidad de agitación fue: 200 rpm (○), 400 rpm (○), 600 rpm (□), 800 rpm (■), y 1000 rpm (△).

3.1.2. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento de *K. oxytoca* CECT 4460

Para la realización de esta batería de ensayos, las condiciones fueron las mismas que en el apartado anterior. El pH se mantuvo constante a $7\pm 0,1$ mediante la adición automática de NaOH, 2 N y H₂SO₄, 1 N al medio de cultivo, la agitación se mantuvo constante a 600 rpm (valor previamente optimizado), y la temperatura de trabajo se varió entre 15°C y 40°C. Los ensayos de temperatura se hicieron de 5°C en 5°C, excepto cuando se indica lo contrario. La variación de la temperatura a lo largo de cada ensayo fue menor de 0,1°C.

3.1.2.1. Ensayos en condiciones anaeróbicas

La Tabla 11 muestra los resultados finales obtenidos en condiciones anaeróbicas. En anaerobiosis el intervalo óptimo de temperatura fue de 25°C a 35°C, puesto que a esas temperaturas no se detectó acumulación de nitrito en el medio de cultivo y se consumió en su totalidad el nitrato. Cinco grados por encima o por debajo de la temperatura óptima (40°C o 20°C respectivamente) se observó una notable acumulación de nitrito en el medio de cultivo (de 4,4 a 15 mM), aunque el nitrato se consumió prácticamente en su totalidad (Tabla 11). Esto sugiere que la reducción de nitrito a óxido de nitrógeno es el paso limitante más importante en el proceso de eliminación de nitrato en condiciones anaeróbicas por *K. oxytoca* CECT 4460.

Tabla 11. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento de *Klebsiella oxytoca* CECT 4460 en condiciones de anaerobiosis.

T (°C)	Nitrato (mM)	Nitrito (mM)	Glicerol (g L ⁻¹)	Peso seco (g L ⁻¹)
15	15	0,03	0,3	1,5
20	0,110	4,4	0,4	1,9
25	<0,100	0	0,2	2,05
30	<0,100	0	0,06	1,7
35	0,120	0	0,04	1,9
40	0,5	15	0,4	1,7

Klebsiella oxytoca CECT 4460 se cultivó en medio mínimo con 20 mM de KNO₃ hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento tardía, entonces una alícuota del cultivo se transfirió al fermentador de 2 L para alcanzar una densidad celular inicial de 0,03-0,08. Se utilizó medio mínimo con agua del Canal V diluida para alcanzar una concentración de 20 mM de nitrato. La agitación se mantuvo constante a 600 rpm y el pH a $7,0\pm 0,1$ mediante al adición de NaOH, 2 N y H₂SO₄, 1 N y no se suministró aire. La temperatura (°C) ensayada se mantuvo constante durante las 48 horas del experimento, especificándose ésta en la columna de la izquierda. Los valores de nitrato (mM), nitrito (mM), glicerol (g L⁻¹) y peso seco (g L⁻¹) se determinaron a las 48 horas de iniciado el ensayo.

La Figura 13A muestra el efecto de la temperatura sobre el crecimiento de *K. oxytoca* CECT 4460 en anaerobiosis. A 25°C, 30°C, y 35°C se alcanzaron densidades celulares similares. El consumo de glicerol a estas temperaturas también siguió cinéticas similares y en todos los casos más del 98% del glicerol inicial fue consumido (Tabla 11). A 15°C, 20°C y 40°C, se observó que la fase de latencia que precedía al crecimiento exponencial fue, al menos, de 10 horas. El crecimiento máximo alcanzado a estas temperaturas fue 5, 1,6 y 3 veces inferior respectivamente, que el alcanzado a 25°C y 30°C (Fig. 5A). El mayor rendimiento, medido como biomasa (g L^{-1}) se obtuvo a 25°C.

3.1.2.3. Ensayos en condiciones aeróbicas

En condiciones aeróbicas el intervalo óptimo de temperatura fue de 25°C a 35°C (Tabla 12). En ese intervalo no se detectó acumulación de nitrito al final de la experiencia. Tanto el consumo de nitrato como de glicerol fue casi total. Se ha de hacer notar que 5°C por encima o por debajo del intervalo óptimo no fue tan crítico como en condiciones de anaerobiosis, puesto que los cultivos alcanzaron un buen rendimiento celular y no acumularon nitrito, aunque a 20°C se detectaron remanentes relativamente altos de nitrato ($> 7 \text{ mM}$). La Figura 13B muestra el efecto de la temperatura sobre el crecimiento de *K. oxytoca* CECT 4460 en aerobiosis, es de interés destacar que en el intervalo óptimo (25-35°C) el crecimiento fue similar. A 20°C la fase de latencia que precedía al crecimiento exponencial fue superior a 20 horas, y la densidad celular máxima alcanzada fue 1,8 veces inferior a la alcanzada a las otras temperaturas ensayadas.

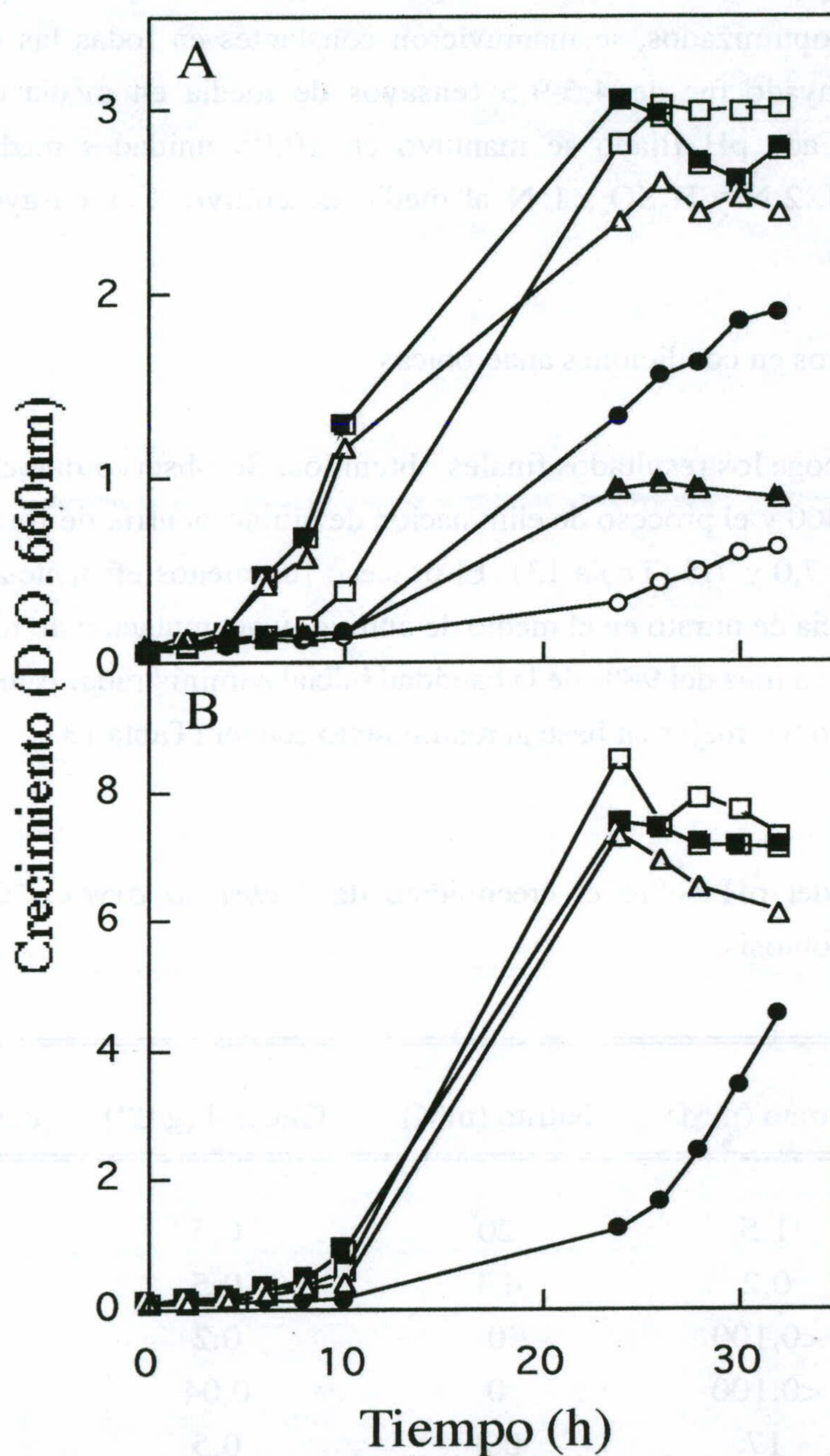
En base a los resultados tanto en anaerobiosis como en aerobiosis, se estableció que la temperatura óptima para la eliminación de nitratos por *K. oxytoca* CECT 4460 se encontraba en un intervalo entre 25-35°C.

Tabla 12. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento de *Klebsiella oxytoca* CECT 4460 en condiciones de aerobiosis.

T (°C)	Nitrato (mM)	Nitrito (mM)	Glicerol (g L^{-1})	Peso seco (g L^{-1})
20	7,4	0	0	2,4
25	1,3	0	0	2,8
30	0,98	0,03	0	3,2
35	0,80	0,02	0	3,4

Las condiciones de cultivo y ensayo son las detalladas en la leyenda de la Tabla 11, excepto que los cultivos se airearon con una tasa de 1 L de aire por L de cultivo por minuto.

Figura 13. Crecimiento de *K. oxytoca* CECT 4460 en el fermentador de 2 L a distintas temperaturas en condiciones anaeróbicas y aeróbicas.



Las condiciones de cultivo y ensayo son las expuestas en la leyenda de la Tabla 11. El panel A muestra los resultados de los cultivos mantenidos en anaerobiosis, mientras que el panel B muestra los resultados obtenidos con cultivos mantenidos en aerobiosis. A los tiempos indicados se determinó la turbidez del cultivo (D.O.₆₆₀) de *K. oxytoca* CECT 4460. La temperatura de cultivo fue: 15°C (○), 20°C (□), 25°C (■), 30°C (△), 35°C (▲), 40°C (▽).

3.1.3. Efecto del pH en el crecimiento de *K. oxytoca* CECT 4460

Para la realización de esta batería de experimentos, las condiciones de ensayo fueron las mismas que en apartados anteriores. La agitación (600 rpm) y la temperatura (25°C), valores previamente optimizados, se mantuvieron constantes en todas las experiencias. El intervalo de pH ensayado fue de 4,5-9,5 (ensayos de media en media unidad, excepto cuando se indica). Cada pH fijado se mantuvo en $\pm 0,05$ unidades mediante la adición automática de NaOH, 2 N y H₂SO₄, 1 N al medio de cultivo. Los ensayos tuvieron una duración de 32 horas.

3.1.3.1. Ensayos en condiciones anaeróbicas

La Tabla 13 recoge los resultados finales obtenidos. Se observó que el crecimiento de *K. oxytoca* CECT 4460 y el proceso de eliminación de nitrato ocurría de forma óptima en el intervalo de pH entre 7,0 y 7,5 (Tabla 13). El proceso fue menos eficiente a pH 6,5 y 8,0, en base a la remanencia de nitrato en el medio de cultivo, y acumulación de nitrito, aunque el glicerol se consumió en más del 98% de la cantidad inicial suministrada. A los pH óptimos el crecimiento bacteriano fue mejor en base al rendimiento celular (Tabla 13).

Tabla 13. Efecto del pH sobre el crecimiento de *Klebsiella oxytoca* CECT 4460 en condiciones de anaerobiosis.

pH	Nitrato (mM)	Nitrito (mM)	Glicerol (g L ⁻¹)	Peso seco (g L ⁻¹)
6,0	1,5	20	0,5	1,3
6,5	0,2	4,1	0,5	1,8
7,0	<0,100	0	0,2	2,06
7,5	<0,100	0	0,04	2,08
8	17	0,3	0,5	1,68

Klebsiella oxytoca CECT 4460 se cultivó en medio mínimo con 20 mM de KNO₃ hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento tardía, entonces una alícuota del cultivo se transfirió al fermentador de 2 L para alcanzar una densidad celular inicial de 0,03-0,08. Se utilizó medio mínimo con agua del Canal V diluida para alcanzar una concentración de 20 mM de nitrato. La agitación se mantuvo constante a 600 rpm, la temperatura a 25°C y no se suministró aire. El pH ensayado se mantuvo constante mediante la adición de NaOH, 2 N y H₂SO₄, 1 N durante las 32 horas del experimento, especificándose éste en la columna de la izquierda. Los valores de nitrato (mM), nitrito (mM), glicerol (g L⁻¹) y peso seco (g L⁻¹) se determinaron a las 32 horas del inicio del ensayo.

3.1.3.2. Ensayos en condiciones aeróbicas

La Tabla 14 recoge los resultados finales obtenidos. Se observó que el intervalo de pH en el cual tanto el crecimiento de *K. oxytoca* CECT 4460, como el proceso de eliminación de nitrato fue óptimo, fue suficientemente ancho y abarcó desde 5,5 a 8,5. Entre pH 6,5 y 8 se observó que a las 24 horas del ensayo, tenía lugar la eliminación completa de glicerol y nitrato sin acumulación de nitrito en el medio de cultivo (datos no mostrados). También se observó que la cantidad de ácido y base que fue necesario añadir al medio de cultivo para mantener constante el pH fijado fue siempre menor en aerobiosis que en anaerobiosis.

La Figura 14 muestra la densidad celular máxima obtenida en ambas condiciones. Se observó que en condiciones de aerobiosis, para cada pH, los rendimientos fueron de 1,5 a 2 veces superiores que al mismo pH en condiciones anaeróbicas en cuanto a turbidez de los cultivos. También se observó que el pH actúa de forma más crítica en condiciones de anaerobiosis, siendo el intervalo óptimo de pH en estas condiciones entre 7-7,5. Este intervalo fue mucho más amplio en condiciones de aerobiosis (entre 5,5 y 8,5).

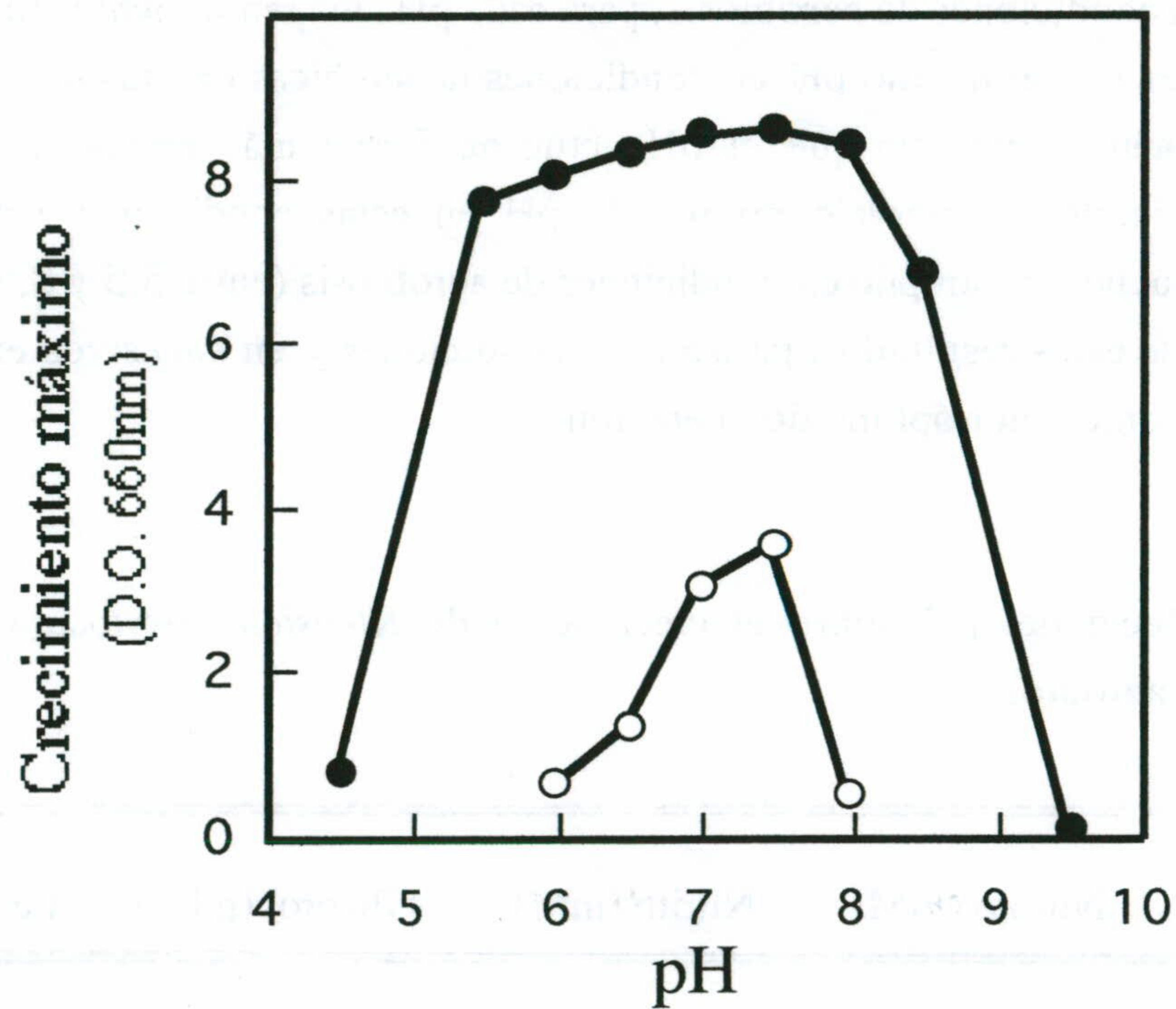
En vista de estos resultados, para ambas condiciones y en sucesivos experimentos, se utilizó pH 7,0 como valor óptimo de operación.

Tabla 14. Efecto del pH sobre el crecimiento de *Klebsiella oxytoca* CECT 4460 en condiciones de aerobiosis.

pH	Nitrato (mM)	Nitrito (mM)	Glicerol (g L ⁻¹)	Peso seco (g L ⁻¹)
4,5	15	0,06	4,5	1,6
5,5	0,150	0	0	3,2
6,0	0,120	0	0	3,8
6,5	<100	0	0,03	2,5
7,0	0,130	0	0	2,8
7,5	0,120	0	0	2,5
8,0	0,115	0	0,04	2,5
8,5	1,2	0,04	0,5	3,1
9,5	19	0,03	5,4	0,6

Las condiciones de cultivo y ensayo son las detalladas en la leyenda de la Tabla 13, excepto que los cultivos se airearon con una tasa de 1 L de aire por L de cultivo por minuto.

Figura 14. Crecimiento de *K. oxytoca* CECT 4460 en el fermentador de 2 L a distintos valores de pH en condiciones anaeróbicas y aeróbicas.



Las condiciones de cultivo fueron las detalladas en la leyenda de la Tabla 13. La agitación se mantuvo constante a 600 rpm y la temperatura a 25°C. El pH ensayado se mantuvo constante mediante la adición de NaOH, 2 N y H₂SO₄, 1 N. Los cultivos se mantuvieron en condiciones de anaerobiosis (o) o aerobiosis (o). El valor de crecimiento (D.O.₆₆₀) indica la densidad celular máxima alcanzada a cada valor de pH.

3.2. OPTIMIZACION DE LAS CONDICIONES DE CRECIMIENTO PARA *ARTHROBACTER GLOBIFORMIS* CECT 4500

Los ensayos fueron llevados a cabo de la misma forma que con *K. oxytoca* CECT 4460, excepto que sólo se realizaron en condiciones de aerobiosis, suministrándose aire a una tasa de 1 L por L de cultivo por minuto, ya que esta cepa no creció en condiciones anaeróbicas.

El medio de cultivo estéril fue inoculado con células de *A. globiformis* CECT 4500 para alcanzar una densidad celular inicial de 0,05-0,1 unidades a 660 nm. A lo largo del tiempo se tomaron muestras para la determinación del crecimiento bacteriano (turbidez a 660 nm), concentración de nitrato, nitrito y ETG. Al final de cada ensayo se determinó el peso seco del cultivo para estimar el rendimiento del cultivo. Los ensayos se dieron por concluidos una vez que el nitrato fue eliminado por completo.

3.2.1. Efecto de la agitación sobre el crecimiento de *A. globiformis* CECT 4500

Para la realización de esta batería de experimentos, la temperatura se fijó a 30°C y el pH se mantuvo constante a un valor de 7,0±0,1 mediante la adición automática de NaOH, 2 N y H₂SO₄, 1 N al medio de cultivo a través de bombas peristálticas.

La agitación (sistema rotacional) se ensayó en un intervalo comprendido entre 200 y 1000 rpm, manteniéndose constante en cada ensayo. Los ensayos se realizaron durante 30-50 horas, tiempo necesario para consumir más del 98% del nitrato inicial. Los resultados finales obtenidos en esta serie de experimentos se presentan en la Tabla 15.

Se observó que a una agitación de 600 rpm el 99% del nitrato fue eliminado en 30 horas, no detectándose acumulación de nitrito. A una velocidad de agitación superior o inferior a 600 rpm se obtuvieron rendimientos similares, aunque los tiempos requeridos para la eliminación de nitrato fueron de aproximadamente 50 horas.

En la Tabla 15 se muestran los rendimientos celulares, determinados como biomasa (g L⁻¹), obtenidos a las diferentes velocidades de agitación. El mayor rendimiento (11 g L⁻¹) se obtuvo a una agitación de 800 rpm; a 400, 600 y 1000 rpm, el rendimiento de los cultivos fue muy similar, siendo éste de alrededor de 6,8-8,7 g L⁻¹. A 200 rpm el rendimiento alcanzado por el cultivo fue tan sólo de 3,3 g L⁻¹.

En base a los resultados obtenidos en cuanto a eliminación de nitrato y crecimiento celular de *A. globiformis* CECT 4500, en sucesivos ensayos se adoptó 600 rpm como velocidad de agitación óptima.

Tabla 15. Efecto de la agitación sobre el crecimiento de *Arthrobacter globiformis* CECT 4500

Agitación	Nitrato (mM)	Nitrito (mM)	Peso seco (g L ⁻¹)	Tiempo (h)
200	3,4	0,6	3,3	55
400	0,2	0,002	8,3	55
600	0,15	0	6,8	30
800	0,08	0,001	11	50
1000	0,15	0,003	8,7	55

Arthrobacter globiformis CECT 4500 se cultivó en medio mínimo con 20 mM de KNO₃ hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento tardía, entonces una alícuota del cultivo se transfirió al fermentador de 2 L para alcanzar una densidad celular inicial de 0,05-0,1 unidades a 660 nm. Se utilizó medio mínimo con agua del Canal V diluida para alcanzar una concentración de 20 mM de nitrato. El suministro continuo de aire fue a una tasa de 1 L por L de cultivo por minuto. La temperatura se mantuvo constante a 30°C y el pH a 7,0±0,1 mediante la adición de NaOH, 2 N y H₂SO₄, 1 N. La agitación (rpm) ensayada se mantuvo constante a lo largo del experimento, especificándose ésta en la columna de la izquierda. Los valores de nitrato (mM), nitrito (mM) y peso seco (g L⁻¹) se determinaron al tiempo final, especificado en la columna de la derecha.

3.2.2. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento de *A. globiformis* CECT 4500

Para la realización de esta batería de ensayos, la agitación se fijó a 600 rpm, y el pH se mantuvo constante a un valor de 7±0,1 mediante la adición automática de NaOH, 2 N y H₂SO₄, 1 N al medio de cultivo.

La temperatura se ensayó en un intervalo comprendido entre 15 y 35°C, con cambios de 5°C en 5°C, manteniéndose constante en cada ensayo. Los resultados finales obtenidos se muestran en la Tabla 16.

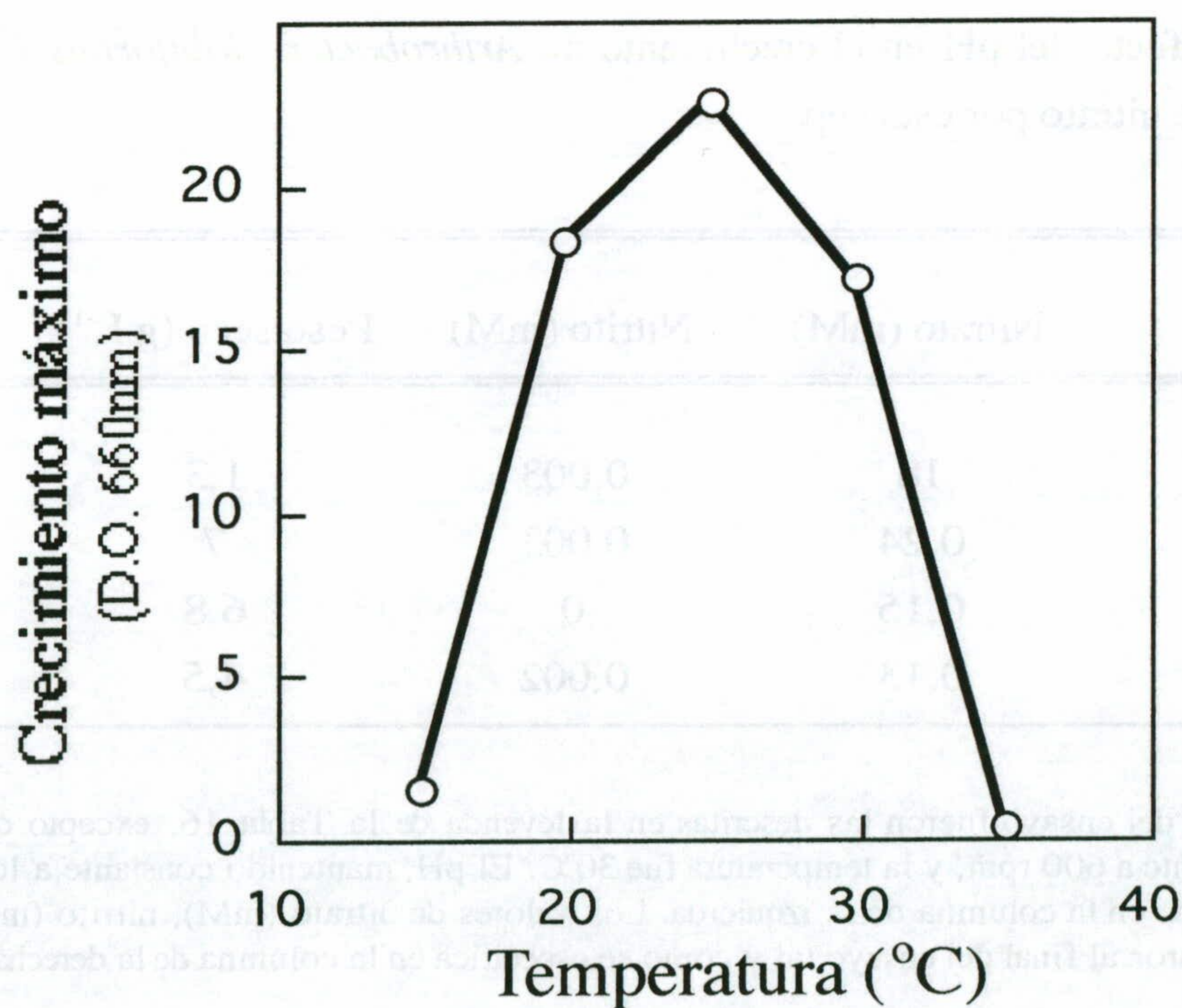
En el intervalo de temperatura entre 20°C y 30°C se obtuvo la eliminación del 99% del nitrato inicial sin acumulación de nitrito. A 30°C el proceso requirió 30 horas, mientras que a 20°C y 25°C se necesitaron del orden de 50 horas para la eliminación total del nitrato. Otra ventaja que se observó a 30°C, fue que la cantidad de ácido y base necesarias para mantener el pH a un valor de 7,0 fue menor que a las otras temperaturas ensayadas (datos no mostrados). La Figura 15 muestra el crecimiento máximo obtenido a las diferentes temperaturas de incubación. Se observa que en el intervalo óptimo entre 20°C y 30°C se obtuvieron los máximos rendimientos, mientras que 5°C por encima o por debajo de este intervalo fueron críticos para el crecimiento de *A. globiformis* CECT 4500. En base a estos resultados, en sucesivos experimentos se utilizó 30°C como temperatura de trabajo.

Tabla 16. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento de *Arthrobacter globiformis* CECT 4500 y la eliminación de nitrato por esta cepa

T (°C)	Nitrato (mM)	Nitrito (mM)	Peso seco (g L ⁻¹)	Tiempo (h)
15°C	13,3	0,003	1,6	50
20°C	0,16	0,003	7,2	52
25°C	0,18	0,001	8,6	55
30°C	0,15	0	6,8	30
35°C	9,8	0,015	1,3	55

Las condiciones del ensayo son las detalladas en la Tabla 15, excepto que la agitación se mantuvo constante a 600 rpm y la temperatura (°C) se varió como se indica en la columna de la izquierda, manteniéndose constante a lo largo de cada ensayo. Los valores de nitrato (mM), nitrito (mM) y peso seco (g L⁻¹) se determinaron al tiempo final, especificado en la columna de la derecha.

Figura 15. Crecimiento de *A. globiformis* CECT 4500 en el fermentador de 2 L a distintas temperaturas.



Las condiciones del ensayo fueron las indicadas en la leyenda de la Tabla 16. El valor de crecimiento (D.O.₆₆₀) indica la densidad celular máxima alcanzada a cada temperatura.

3.2.3. Efecto del pH sobre el crecimiento de *A. globiformis* CECT 4500

Para la realización de esta batería de ensayos, tanto la agitación como la temperatura fueron fijadas a 600 rpm y 30°C respectivamente.

El pH se varió en el intervalo comprendido entre 5,0 y 8,0 con cambios de 1 en 1 unidad, manteniéndose éste constante en cada ensayo mediante la adición automática de NaOH, 2 N y H₂SO₄, 1 N al medio de cultivo. Los resultados finales obtenidos en esta serie de experimentos se muestran en la Tabla 17.

En el intervalo de 6,0 a 8,0 se observó una eficacia superior al 99% de eliminación de nitrato sin acumulación de nitrito. A pH 7 el proceso de eliminación de nitrato fue más rápido, necesitándose tan solo 30 horas, a diferencia con los otros valores de pH ensayados, a los cuales el tiempo medio necesario para obtener la eliminación total de nitrato fue de unas 50 horas.

En la Tabla 17 se observa que a pH 6 y 7 se obtuvo el mayor rendimiento de los cultivos, 7 y 6,8 g de biomasa L⁻¹. A pH 8,0 el rendimiento obtenido (4,5 g L⁻¹) fue casi la mitad del obtenido en el intervalo óptimo, mientras que a pH 5,0 el crecimiento bacteriano fue limitado, lo cual se vio reflejado en el bajo rendimiento resultante (1,3 g L⁻¹). En base a estos resultados, en sucesivos experimentos se utilizó pH 7,0 como un valor óptimo de operación.

Tabla 17. Efecto del pH en el crecimiento de *Arthrobacter globiformis* CECT 4500 y la eliminación de nitrato por esta cepa

pH	Nitrato (mM)	Nitrito (mM)	Peso seco (g L ⁻¹)	Tiempo (h)
5	18	0,003	1,3	50
6	0,24	0,003	7	52
7	0,15	0	6,8	30
8	0,13	0,002	4,5	51

Las condiciones del ensayo fueron las descritas en la leyenda de la Tabla 16, excepto que la agitación se mantuvo constante a 600 rpm, y la temperatura fue 30°C. El pH, mantenido constante a lo largo del ensayo, fue el especificado en la columna de la izquierda. Los valores de nitrato (mM), nitrito (mM) y peso seco (g L⁻¹) se determinaron al final del ensayo tal y como se especifica en la columna de la derecha.

4. OPTIMIZACION DE LA CONCENTRACION INICIAL DE NITRATO EN CULTIVOS ESTANCOS

En esta batería de ensayos se pretendía determinar si la concentración inicial de nitrato en el medio de cultivo afectaba al crecimiento de las cepas *K. oxytoca* CECT 4460 y *A. globiformis* CECT 4500. Los experimentos se llevaron a cabo en un fermentador de 2 L de volumen de trabajo (Biostat B, Braun-Biotech), y las condiciones operacionales fueron, agitación, 600 rpm; temperatura, 25-30°C y pH, 7±0,1.

4.1. *KLEBSIELLA OXYTOCA* CECT 4460

Células de *K. oxytoca* CECT 4460 se cultivaron en medio mínimo con 20 mM de KNO₃ durante 12-24 horas a 30°C, entonces una alícuota del cultivo se transfirió a un fermentador de 2 L conteniendo el mismo medio de cultivo, excepto que se utilizaron aguas del Canal V para obtener una concentración inicial de nitrato de entre 30 y 160 mM. En cada uno de los ensayos, se tomaron muestras cada 2 horas aproximadamente para la determinación de nitrato, nitrito, y glicerol, así como para la determinación de la biomasa del cultivo y el rendimiento referido a glicerol. Los datos obtenidos se resumen en la Tabla 18.

Se observó que la fase de latencia que precedía a la fase exponencial de crecimiento, así como el tiempo de generación en la fase exponencial, se vieron influenciados por la concentración inicial de nitrato. Cuanto mayor fue la concentración inicial de nitrato, más larga fue la fase de latencia (entre 0 horas en 30 mM de nitrato y 24 horas en 160 mM de nitrato) y mayor el tiempo de generación una vez que el crecimiento celular se reanudó (entre 3,3 horas en 30 mM de nitrato y 10,2 horas en 160 mM de nitrato).

Cuando la concentración inicial de nitrato fue menor o igual a 100 mM, *K. oxytoca* CECT 4460 fue capaz de consumir más del 99% del nitrato sin acumulación significativa de nitrito. Cuando la concentración de nitrato se incrementó a 160 mM, una proporción del nitrato inicial (alrededor del 30%) fue consumido sin acumulación de nitrito (Tabla 18); a concentraciones superiores no se observó consumo de nitrato (datos no mostrados).

El rendimiento de los cultivos en cuanto a la fuente de carbono, determinado como g de peso seco por g de glicerol consumido, fue del orden de 0,1-0,13 independientemente de la concentración inicial de nitrato en el medio de cultivo (Tabla 18).

La tasa de consumo de nitrato por *K. oxytoca* CECT 4460 a diferentes concentraciones de nitrato (20-100 mM) fue del orden de 0,7±0,1 g NO₃⁻ por g de proteína celular por hora.

Los enzimas de la ruta asimilatoria de nitrato se detectaron en esta cepa cuando fue cultivada en un medio conteniendo nitrato, pero no cuando se cultivó en un medio con amonio como única fuente de nitrógeno. La actividad nitrato reductasa, el primer enzima de la ruta asimilatoria de nitrato, se determinó en *K. oxytoca* CECT 4460, observándose que el

Tabla 18. Efecto de la concentración inicial de nitrato en el crecimiento de *Klebsiella oxytoca* CECT 4460.

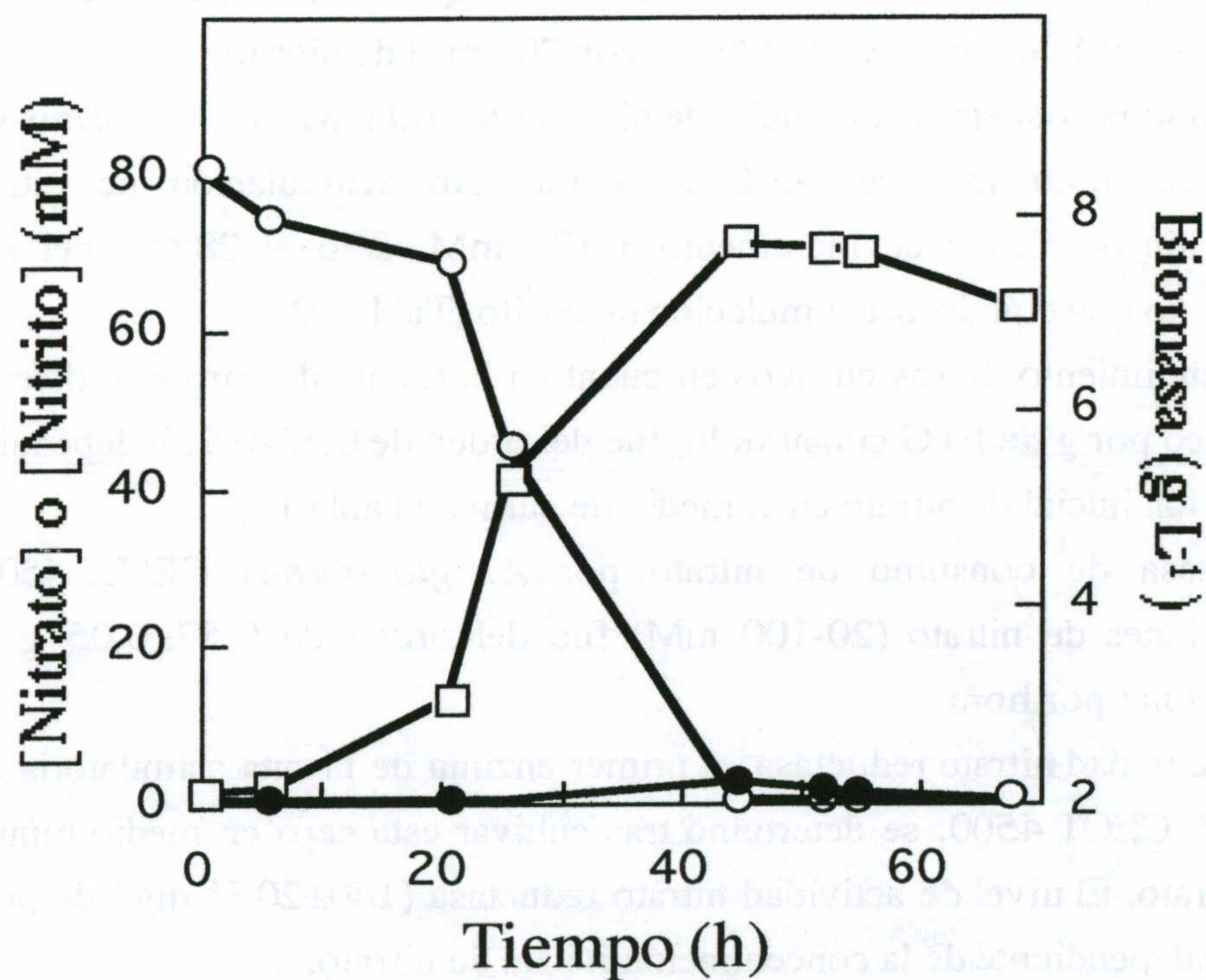
NO ₃ ⁻ (mM) inicial	NO ₃ ⁻ (mM) final	Latencia (h)	Tiempo de Generación (h)	NO ₂ ⁻ (mM)	Glicerol (g L ⁻¹)	Peso Seco (g L ⁻¹)	Y _{Glicerol} (g g Gli. ⁻¹)	Tiempo (h)
30	0,1	0	3,3	0	0	5,5	0,12	32
40	0,2	2	3,5	0,01	0,17	6,7	0,13	48
80	0,1	6	4,1	0,10	0,10	7,7	0,10	68
100	0,8	20	6,2	0,11	0,04	8,8	0,10	76
160	110	24	10,2	0,02	3,20	2,1	-	>96

Klebsiella oxytoca CECT 4460 se cultivó en medio mínimo con 20 mM de KNO₃ hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento tardía, entonces una alícuota del cultivo se transfirió al fermentador de 2 L, cargado con agua diluida del Canal V para alcanzar la concentración de nitrato inicial indicada en la columna de la izquierda. La cantidad de carbono suministrada fue de 10 g por L por cada fracción de 20 mM de NO₃⁻. Las condiciones operacionales fueron: aireación, 1 L por L de cultivo por minuto; agitación, 600 rpm; temperatura, 30°C; pH, 7±0,1. La concentración inicial y final de NO₃⁻ (mM), y la concentración final de NO₂⁻ (mM), glicerol (g L⁻¹), y peso seco (g L⁻¹) se determinaron al final del ensayo, el cual se indica en la última columna de la derecha. El rendimiento del cultivo se expresa como g de biomasa producida por g de glicerol consumido. El tiempo de generación se refiere al tiempo de duplicación en la fase exponencial de crecimiento. Latencia (h) se refiere al tiempo requerido antes del inicio del crecimiento exponencial del cultivo.

nivel fue igualmente alto en células creciendo exponencialmente a diferentes concentraciones de nitrato (entre 30 y 160 mM), siendo del orden de 1200 ± 200 U mg^{-1} de proteína total.

La Figura 16 recoge el crecimiento celular, el consumo de nitrato y la acumulación de nitrito de *K. oxytoca* CECT 4460 cuando la concentración inicial de nitrato fue 80 mM. Tras una fase de latencia de aproximadamente 6 horas, simultáneamente al crecimiento celular, el nitrato presente en el medio de cultivo fue consumido hasta que su nivel cayó por debajo del límite de detección ($<100 \mu\text{M}$ nitrato), no se detectó acumulación significativa de nitrito a lo largo del experimento. El glicerol (no mostrado en la Figura) también fue consumido hasta niveles por debajo de su límite de detección ($<0,1$ g de glicerol por L).

Figura 16. Eliminación de nitrato por *Klebsiella oxytoca* CECT 4460 en el fermentador de 2 L.



Las condiciones de ensayo fueron las dadas en la leyenda de la Tabla 18 cuando la concentración inicial de nitrato fue 80 mM. A los tiempos indicados se determinó la concentración de nitrato (○), nitrito (●) y biomasa bacteriana (□).

4.2. ARTHROBACTER GLOBIFORMIS CECT 4500

Células de *A. globiformis* CECT 4500 se cultivaron de igual forma que en el apartado anterior. Tras 24 horas de incubación a 30°C, una alícuota del cultivo se transfirió al fermentador de 2 L con el mismo medio de cultivo, excepto que se utilizaron aguas del Canal V para obtener una concentración de nitrato inicial de entre 20 y 200 mM. En cada uno de los ensayos, se tomaron muestras cada 2 horas aproximadamente para la determinación de nitrato, nitrito, ETG, así como para la determinación de la biomasa del cultivo y el rendimiento referido a ETG. Los datos obtenidos se resumen en la Tabla 19.

Se observó un comportamiento similar al observado para *K. oxytoca* CECT 4460. Tanto la fase de latencia que precedía a la fase exponencial de crecimiento, como el tiempo de generación en la fase exponencial, se vieron influenciados por la concentración inicial de nitrato en el medio de cultivo. Cuanto mayor fue la concentración inicial de nitrato, más larga fue la fase de latencia (entre 6 horas con 20 mM de nitrato y 52 horas con 200 mM de nitrato) y mayor el tiempo de generación una vez que el crecimiento se reanudó (entre 3,7 horas con 20 mM de nitrato y 18,7 horas con 200 mM de nitrato).

Cuando la concentración inicial de nitrato fue 100 mM, *A. globiformis* CECT 4500 fue capaz de consumir más del 99% del nitrato sin acumulación de nitrito. Cuando la concentración de nitrato se incrementó a 175 mM, sólo el 28,6% del nitrato inicial se consumió, no detectándose acumulación de nitrito (Tabla 19).

El rendimiento de los cultivos en cuanto a la fuente de carbono, determinado como g de peso seco por g de ETG consumido, fue del orden de 0,53-0,7, independientemente de la concentración inicial de nitrato en el medio de cultivo (Tabla 19).

La tasa de consumo de nitrato por *A. globiformis* CECT 4500 a diferentes concentraciones de nitrato (20-100 mM) fue del orden de $0,57 \pm 0,05$ g NO_3^- por g de proteína celular por hora.

La actividad nitrato reductasa, el primer enzima de la ruta asimilatoria de nitrato en *A. globiformis* CECT 4500, se determinó tras cultivar esta cepa en medio mínimo con 20-200 mM de nitrato. El nivel de actividad nitrato reductasa (140 ± 20 U mg^{-1} de proteína total) fue similar e independiente de la concentración inicial de nitrato.

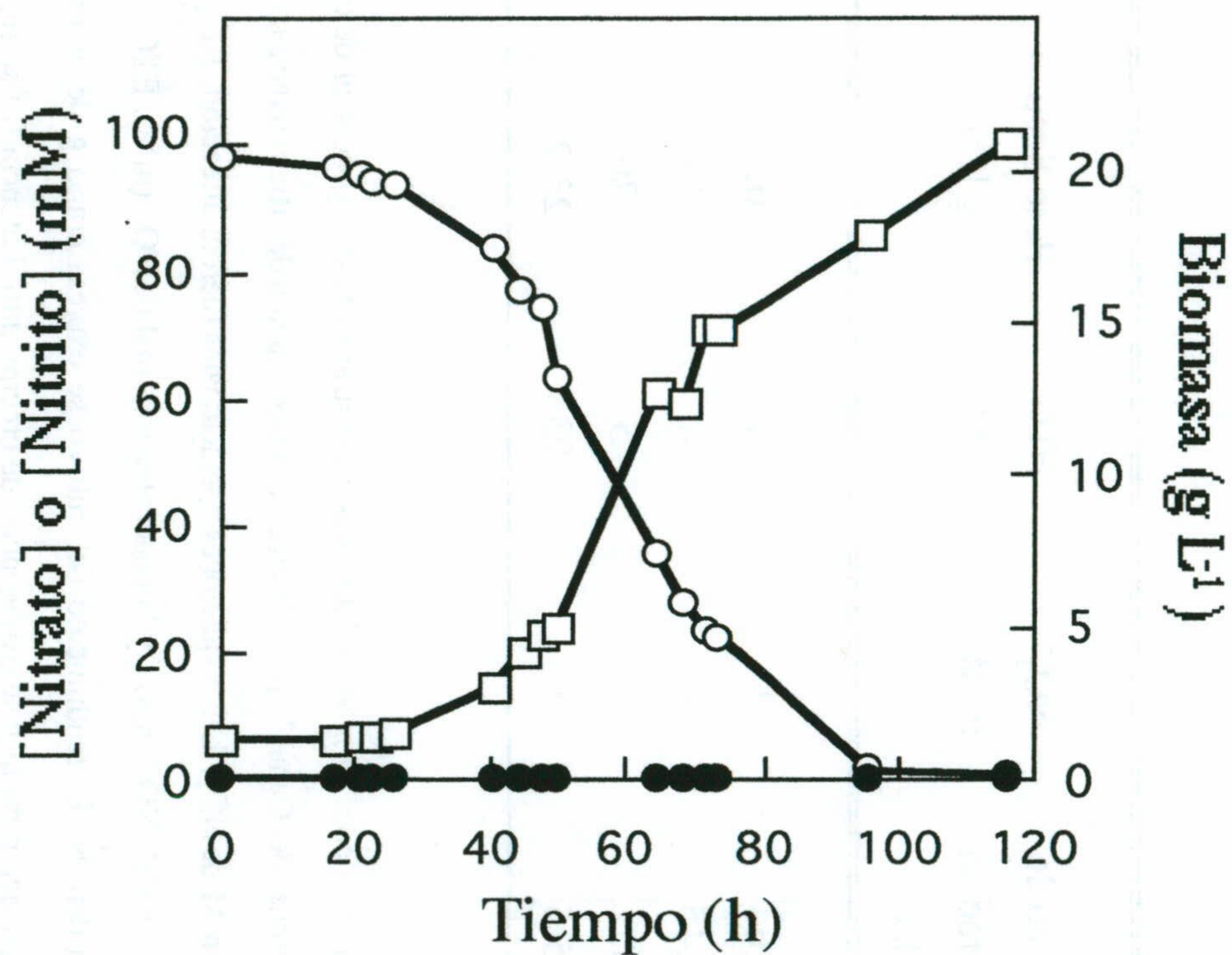
La Figura 17 recoge el crecimiento celular, el consumo de nitrato y la acumulación de nitrito en un cultivo de *A. globiformis* CECT 4500 cuando la concentración inicial de nitrato fue 100 mM. Tras una fase de latencia de aproximadamente 21 horas, simultáneamente al crecimiento celular, el nitrato presente en el medio de cultivo fue consumido hasta que su nivel cayó por debajo del límite de detección. No se detectó acumulación de nitrito a lo largo del ensayo.

Tabla 19. Efecto de la concentración inicial de nitrato en el crecimiento de *Arthrobacter globiformis* CECT 4500.

NO ₃ ⁻ (mM) inicial	NO ₃ ⁻ (mM) final	Latencia (h)	Tiempo de Generación (h)	NO ₂ ⁻ (mM)	ETG (g L ⁻¹)	Peso Seco (g L ⁻¹)	Y _{ETG} (g g ETG ⁻¹)	Tiempo (h)
20	0,2	6	3,64	0	4	6,8	0,6	30
45	0,3	17	5,45	0	4	14	0,7	70
100	0,7	21	6,6	0	5	20	0,53	116
175	125	24	15,5	0	23	23,2	0,56	> 116

Arthrobacter globiformis CECT 4500 se cultivó en medio mínimo con 20 mM de NO₃⁻ hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento tardía, entonces una alícuota del cultivo se transfirió al fermentador de 2 L cargado con aguas diluidas del Canal V para alcanzar la concentración de nitrato indicada en la columna de la izquierda. La cantidad de carbono suministrada fue de 10 g por L por cada fracción de 20 mM de NO₃⁻. Las condiciones operacionales fueron: aireación, 1 L por L de cultivo por minuto; agitación, 600 rpm; temperatura, 30°C; pH, 7±0,1. La concentración inicial y final de NO₃⁻ (mM), y la concentración final de NO₂⁻ (mM), ETG (g L⁻¹), y peso seco (g L⁻¹) se determinaron al final del ensayo, el cual se indica en la última columna de la derecha. El rendimiento del cultivo se expresa como g de biomasa producida por g de etilenglicol (ETG) consumido. El tiempo de generación se refiere al tiempo de duplicación en la fase exponencial de crecimiento. Latencia (h) se refiere al tiempo requerido antes del inicio del crecimiento exponencial del cultivo.

Figura 17. Eliminación de nitrato y crecimiento de *Arthrobacter globiformis* CECT 4500 en el fermentador de 2L.



Las condiciones de ensayo fueron las dadas en la leyenda de la Tabla 19. La concentración inicial de nitrato fue 100 mM. La concentración de nitrato (o), nitrito (o) y biomasa bacteriana (□), se determinaron a los tiempos que se indican.

5. OPTIMIZACION DE LAS CONDICIONES NUTRICIONALES EN CULTIVOS ESTANCOS EN FERMENTADORES DE 2 L

Una vez optimizadas las condiciones operacionales en el fermentador de 2 L para las cepas *K. oxytoca* CECT 4460 y *A. globiformis* CECT 4500, tolerantes a altas concentraciones de nitrato, se ensayó la reducción de costes en el proceso de eliminación de nitrato mediante la reducción en el aporte de nutrientes a los medios de cultivo, éstos se reducirían hasta aquellos límites que permitieran la eliminación efectiva de nitrato sin acumulación de nitrito en el medio de cultivo. Asimismo, se ensayó la utilización de fuentes de carbono alternativas de menor coste económico que glicerol y ETG.

Los nutrientes estudiados fueron:

a) Fosfatos

Los fosfatos se utilizan en el medio de cultivo no sólo como fuente de fósforo, un elemento esencial de todos los seres vivos, sino también como tampón de pH. Dado que el pH se puede controlar en este sistema mediante la adición automática de ácido y base, se propuso reducir progresivamente la concentración del tampón fosfato (M8) hasta límites que permitieran la operación del sistema en condiciones óptimas. Asimismo, esta reducción fue necesaria en vistas a mantener la concentración de fosfato por debajo de los límites legales de vertido a corrientes públicas.

b) Magnesio

De los nutrientes minerales necesarios para los microorganismos, el magnesio es el más importante, siendo de hecho su concentración en los cultivos standard del orden de 1 mM. Se propuso reducir progresivamente la concentración de este componente y establecer su importancia en la eliminación de nitrato.

c) Micronutrientes

En este tipo de ensayos se pretendió disminuir la concentración de hierro presente en el medio de cultivo, así como de los elementos traza presentes en el mismo hasta límites que no interfirieran con el buen funcionamiento del sistema.

d) Fuentes de carbono alternativas

En este apartado se estudió la posibilidad de utilizar fuentes de carbono alternativas de bajo coste económico para el proceso de eliminación de nitratos. Entre otras, se utilizaron vinazas de una alcoholera de Motril (Granada) y melazas de caña de azúcar y remolacha.

5.1. DISMINUCION DEL TAMPON FOSFATO Y MICRONUTRIENTES EN EL MEDIO DE CULTIVO

Estos ensayos se llevaron a cabo en fermentadores de 2 L bajo las condiciones de operación óptimas obtenidas en el apartado 3 de Resultados (agitación, 600 rpm; temperatura, 25-30°C; pH, 7±0,1). El medio de cultivo utilizado fue el descrito en el apartado de Materiales y Métodos para los cultivos estancos, utilizándose como fuente de nitrógeno el nitrato presente en las aguas del Canal V convenientemente diluidas para obtener una concentración inicial de 20 mM, y variándose sólo el nutriente a ensayar, manteniéndose los otros constantes. Como fuente de carbono se utilizó glicerol en el caso de *K. oxytoca* CECT 4460, y etilenglicol en el caso de *A. globiformis* CECT 4500, a una concentración final en el medio de cultivo de 10 g L⁻¹.

La concentración de los nutrientes en el medio de cultivo se disminuyó entre 1/2 y 1/100, y se determinó su efecto sobre el funcionamiento del sistema de eliminación de nitrato.

Para ambas cepas, se observó que mientras el pH se mantuviera constante con un valor entre 6,5-7,5, el tampón fosfato podía ser reducido en el medio de cultivo a una concentración de 0,4 mM (1/100) sin un efecto significativo sobre la eficiencia en la eliminación de nitrato, la utilización de las fuentes de carbono, el rendimiento en la utilización de glicerol (alrededor de 0,5 g de biomasa por g de glicerol consumido) y nitrato (alrededor de 3,5 g de biomasa por g de NO₃⁻ consumido) y sin acumulación de nitrito. En la Tabla 20 se muestran los datos obtenidos para *K. oxytoca* CECT 4460 en condiciones de aerobiosis.

El contenido en MgSO₄ pudo ser reducido 1/2 para la cepa CECT 4500 y 1/4 para la cepa CECT 4460 con respecto a la cantidad standard suministrada en el medio de cultivo (datos no mostrados). El suministro de Fe (6 mg mL⁻¹) y elementos traza pudo ser reducido hasta 50 veces para la cepa CECT 4460 y tan sólo a la mitad para la cepa CECT 4500, con respecto a la cantidad usada en el medio de cultivo standard.

Tabla 20. Efecto de la reducción del tampón fosfato en el crecimiento y en la eliminación de nitrato por *Klebsiella oxytoca* CECT 4460 en aerobiosis.

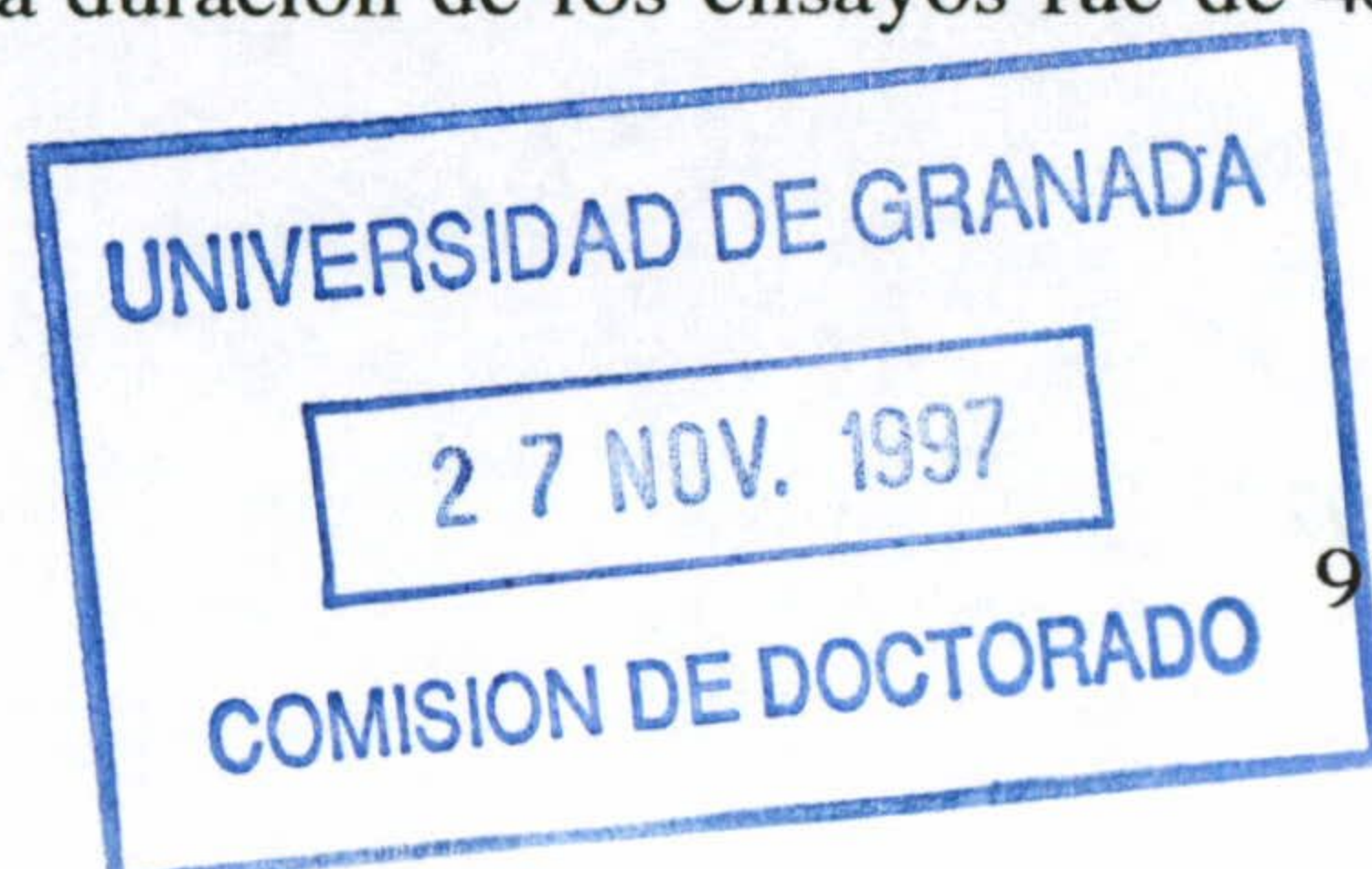
Tampón P (mM)	Nitrato (mM)	Nitrito (mM)	Glicerol (g L ⁻¹)	Peso seco (g L ⁻¹)	Y _{NO₃-} (g g(NO ₃ ⁻) ⁻¹)	Y _{Glicerol} (g g Gli ⁻¹)
20	0,15	0	0	5,09	3,70	0,51
10	0,1	0	0,05	5,40	4,15	0,47
2,6	0,08	0	0	5,25	3,70	0,46
0,65	0,1	0	0	5,15	3,34	0,51
0,4	0,25	0,08	0,03	4,90	3,70	0,50
0	5	0,197	0,02	4,60	3,40	0,43

Klebsiella oxytoca CECT 4460 se cultivó en medio mínimo standard con 20 mM de KNO₃ hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento tardía, entonces una alícuota del cultivo se transfirió al fermentador de 2 L para alcanzar una densidad celular inicial de 0,03-0,08 unidades. La agitación se mantuvo a 600 rpm, la temperatura a 25°C, y el pH se mantuvo constante a 7±0,1 mediante la adición de NaOH, 2 N y H₂SO₄, 1 N durante las 32 horas del experimento. Se utilizó medio mínimo con agua del Canal V diluida para alcanzar una concentración de nitrato de 20 mM, y se varió sólo la concentración del tampón fosfato, la cual viene especificada en la columna de la izquierda. Los valores de nitrato (mM), nitrito (mM), glicerol (g L⁻¹) peso seco (g L⁻¹), Y_{NO₃-} y Y_{glicerol} (g g sustrato⁻¹) se determinaron a las 32 horas de iniciado el ensayo.

5.2. UTILIZACION DE FUENTES ALTERNATIVAS DE CARBONO DE BAJO COSTE ECONOMICO

Uno de los factores más críticos, desde el punto de vista económico, en el proceso de eliminación de nitrato es el aporte de la fuente de carbono. Por este motivo, se estudió la posibilidad de utilizar fuentes de carbono alternativas de bajo coste económico. En este apartado se estudió el efecto que ejercía sobre la eficiencia en la eliminación de nitrato la utilización de vinazas de una alcoholera y melazas, tanto de caña de azúcar como de remolacha, sobre el crecimiento de *K. oxytoca* CECT 4460 y *A. globiformis* CECT 4500.

Estos ensayos se realizaron a 30°C en matraces de 250 mL, el volumen del medio de cultivo fue del 20% del volumen total. El medio de cultivo utilizado fue el descrito en el apartado de Materiales y Métodos para los cultivos estancos, como fuente de nitrógeno se utilizó el nitrato presente en las aguas del Canal V convenientemente diluidas para obtener una concentración inicial de 20 mM. Como fuente de carbono se utilizaron vinazas y melazas, tanto de caña de azúcar como de remolacha. La duración de los ensayos fue de 48 horas.



En estos ensayos se observó que ninguna de las cepas creció con vinazas como única fuente de carbono (datos no mostrados). En cuanto a los ensayos realizados con las melazas de caña de azúcar, se abandonó la idea de utilizarlas como fuente de carbono debido a la gran viscosidad y coloración que presentaban, lo cual interfería con las medidas de turbidez del cultivo y con la determinación de nitritos en el medio de cultivo (datos no mostrados). Por lo tanto, se eligió melazas de remolacha como fuente de carbono, cuya composición fue la siguiente: H₂O, 20%; azúcar, 40-52%; materia orgánica, 20-25%; materia mineral, 10%. Se ensayaron diferentes concentraciones de la mismas, siendo su concentración final: 0,5, 1, 2, 4, y 8% (p/v).

Se observó que ambas cepas fueron capaces de utilizar melazas de remolacha como única fuente de carbono, requiriendo alrededor de un 4% (p/v) de melazas para consumir totalmente 20 mM de nitrato. Los resultados obtenidos se muestran en la Tablas 21 y 22.

K. oxytoca CECT 4460 fue capaz de consumir totalmente el nitrato suministrado en el medio de cultivo sin acumulación de nitrito a las 24 horas del experimento cuando la concentración de melaza fue del 4% (p/v). *A. globiformis* CECT 4500 también fue capaz de eliminar 20 mM de nitrato sin acumulación de nitrito cuando la melaza se suministró a una concentración de entre 4 y 8% (p/v); no obstante, se detectaron algunas diferencias con respecto a la cepa CECT 4460. Cuando *A. globiformis* CECT 4500 se cultivó en medio mínimo con melazas como única fuente de carbono, el cultivo adquirió una gran viscosidad, quizás debido a la acumulación de algún polímero por esta cepa, observándose que con una concentración del 8% (p/v) de la melaza en el medio de cultivo, era imposible la separación de las células por centrifugación del medio de cultivo. Este fenómeno no fue observado con células de *K. oxytoca* CECT 4460.

La optimización del proceso de eliminación de nitratos, en cuanto al uso de fuentes de carbono alternativas de bajo coste económico, se presenta en detalle en el capítulo 3 de la Sección de Resultados.

Tabla 21. Efecto de la utilización de melazas de remolacha como fuente de carbono sobre el crecimiento de *Klebsiella oxytoca* CECT 4460.

Melaza (% p/v)	Nitrato (mM)	Nitrito (mM)	Peso seco (g L ⁻¹)
0,5	11,7	0,4	2,90
1	0,9	10,7	3,80
2	3,4	15,9	3,50
4	0	0	6,70
8	0	0	7,60

Klebsiella oxytoca CECT 4460 se cultivó en medio mínimo con agua del Canal V diluida para alcanzar una concentración de 20 mM de nitrato, y melazas de remolacha como fuente de carbono a diferentes proporciones, las cuales vienen especificadas en la columna de la izquierda. La concentración de nitrato (mM), nitrito (mM), y el peso seco (g L⁻¹) se determinaron al final del ensayo (48 horas).

Tabla 22. Efecto de la utilización de melazas de remolacha como fuente de carbono sobre el crecimiento de *Arthrobacter globiformis* CECT 4500.

Melaza (% p/v)	Nitrato (mM)	Nitrito (mM)	Peso seco (g L ⁻¹)
0,5	12,9	0,03	2,63
1	8,3	0,13	3,40
2	3,0	20	4,55
4	0,4	7	5,60
8	0,4	0	5,70

Las condiciones del ensayo fueron como las descritas en la Tabla 21, excepto que la cepa utilizada fue *A. globiformis* CECT 4500.

Table 1. The results of the regression analysis of the relationship between the variables of the model.

Variable	Parameter estimate	Standard error	t-statistic	Probability > t
Intercept	1.00	0.05	20.00	<.0001
X1	0.15	0.02	7.50	<.0001
X2	0.10	0.03	3.33	<.001
X3	0.05	0.04	1.25	.215
X4	0.02	0.05	0.40	.691

The results of the regression analysis are presented in Table 1. The intercept is 1.00, and the coefficients for X1, X2, X3, and X4 are 0.15, 0.10, 0.05, and 0.02, respectively. The standard errors are 0.05, 0.02, 0.03, and 0.04, respectively. The t-statistics are 20.00, 7.50, 3.33, and 1.25, respectively. The probabilities are <.0001, <.0001, <.001, and .215, respectively.

Table 2. The results of the regression analysis of the relationship between the variables of the model.

Variable	Parameter estimate	Standard error	t-statistic	Probability > t
Intercept	1.00	0.05	20.00	<.0001
X1	0.15	0.02	7.50	<.0001
X2	0.10	0.03	3.33	<.001
X3	0.05	0.04	1.25	.215
X4	0.02	0.05	0.40	.691

The results of the regression analysis are presented in Table 2. The intercept is 1.00, and the coefficients for X1, X2, X3, and X4 are 0.15, 0.10, 0.05, and 0.02, respectively. The standard errors are 0.05, 0.02, 0.03, and 0.04, respectively. The t-statistics are 20.00, 7.50, 3.33, and 1.25, respectively. The probabilities are <.0001, <.0001, <.001, and .215, respectively.

II. ESCALADO DEL SISTEMA DE ELIMINACION DE NITRATO A UNA PLANTA PILOTO DE 40 L DE CAPACIDAD OPERADA EN UNA FABRICA DE PRODUCCION DE EXPLOSIVOS

Resumen

Una vez que en el laboratorio se habían establecido las condiciones óptimas operacionales y nutricionales para la eliminación de nitrato por *Klebsiella oxytoca* CECT4460 y *Arthrobacter globiformis* CECT 4500, se procedió al escalado del sistema. En este capítulo se describe el escalado del sistema de eliminación de nitrato en una planta piloto de 40 L de capacidad, la cual fue operada tanto en estanco como en continuo en la fábrica Paramo de Masa (Burgos) de Unión Española de Explosivos, utilizando aguas residuales procedentes de la fabricación de dinitroetilenglicol (DNEG). Cuando la planta piloto funcionó en continuo, el nivel de nitrato en el efluente fue inferior al 0,5% del nivel inicial. Tanto nitrito como amoníaco fueron indetectables, y el nivel de la fuente de carbono en el efluente fue inferior 50 mg L⁻¹. En base a estos resultados se consideró que la planta funcionó satisfactoriamente.

Con objeto de determinar la validez del sistema biológico de eliminación de nitrato en aguas residuales industriales, estudiado en el capítulo anterior, se consideró necesario el escalado del sistema a reactores de mayor volumen, así como establecer si el funcionamiento de las cepas seleccionadas sería eficiente en la eliminación del contaminante en la propia fábrica.

El escalado del sistema se abordó primero en nuestro laboratorio en la Estación Experimental del Zaidín en Granada, utilizando un reactor de 20 L de capacidad. En este reactor se controló tanto la agitación como la temperatura, y se operó en condiciones anéxicas. Los ensayos se realizaron con *K. oxytoca* CECT 4460 tanto en condiciones anaeróbicas como aeróbicas. Los resultados obtenidos fueron similares a los reportados en el capítulo anterior en el reactor de 2 L, y confirmaron que era posible un escalado del sistema de eliminación de nitrato conservando todos los parámetros citados anteriormente (Datos no mostrados). Por tanto, el siguiente paso fue el escalado del sistema de eliminación de nitrato en una planta piloto de 40 L de capacidad en la fábrica Paramo de Masa (Burgos) perteneciente a Unión Española de Explosivos.

1. ELIMINACION DE NITRATO EN CULTIVOS ESTANCOS EN UNA PLANTA PILOTO DE 40 L DE CAPACIDAD.

1.1. UTILIZACION DE AGUAS SUBTERRANEAS PARA LA DILUCION DE LAS AGUAS RESIDUALES PROCEDENTES DE LA PRODUCCION DE DNEG

Las aguas residuales procedentes de la fabricación de dinitroetilenglicol tuvieron que ser diluidas antes del tratamiento biológico de las mismas. De este modo, además del coste debido al suministro de nutrientes, un coste adicional en la operación de la planta de tratamiento biológico fue el del agua usada para diluir el efluente contaminado.

Para reducir el coste económico de este factor, se ensayaron dos tipos de aguas: agua desionizada y agua subterránea. El agua subterránea procedía de un pozo existente en terrenos de la propia fábrica, denominado EBUIII, y su composición (mg L^{-1}) fue la siguiente: magnesio, 9,4; hierro, 0,16; calcio, 49,3; sodio, 2,1; potasio, 4,6; carbonato, 3,0; bicarbonato, 32,9; nitrato, 0,5; cloruro, 21; y sulfato, 45. Los niveles de molibdeno, cobre, zinc, cobalto, níquel y manganeso fueron inferiores a $0,1 \text{ mg L}^{-1}$. Estas aguas fueron usadas para diluir las aguas residuales procedentes de la producción de dinitroetilenglicol y alcanzar un nivel inicial de nitratos de alrededor de 20-100 mM. Los nutrientes fueron suministrados para alcanzar la concentración indicada en el medio de cultivo standard (ver Materiales y Métodos), salvo el hierro, los micronutrientes y el tampón fosfato, los cuales se suministraron a la mitad de la concentración dada en Materiales y Métodos.

Las condiciones operacionales en el fermentador de 40 L fueron las siguientes: el aire fue burbujado a una tasa de 0,3 L por L de cultivo por minuto; el cultivo fue agitado con un motor a 350 rpm; el pH se mantuvo constante automáticamente a un valor de $7,0 \pm 0,1$ mediante la adición de 3,5 M NaOH y 3,5 M H_2SO_4 ; y la temperatura se mantuvo constante entre 25 y 30°C.

El nitrato suministrado en el medio de cultivo, procedente de las aguas residuales de la producción de DNEG, fue consumido en 24 horas independientemente del agua utilizada para la dilución de las aguas residuales (Tabla 23), siendo el consumo de nitrato superior al 97% en ambos casos. Con ninguna de las aguas utilizadas se detectó acumulación de nitrito o amoníaco en el medio de cultivo. La biomasa alcanzada por el cultivo cuando se utilizó agua desionizada fue de $4,9 \text{ g L}^{-1}$, mientras que con agua subterránea fue de $5,8 \text{ g L}^{-1}$. El consumo de glicerol también resultó ser muy similar en ambos casos (Tabla 23), el cual fue prácticamente total. En general, se puede decir que no hubo diferencias significativas en los parámetros medidos en el medio de cultivo dependiendo del tipo de agua utilizada para la dilución de las aguas residuales, por este motivo, en sucesivos experimentos se utilizó aguas subterráneas procedentes del pozo EBUIII para la dilución del agua del Canal V en los experimentos realizados en la planta piloto.

Tabla 23. Efecto del agua utilizada para la dilución de las aguas residuales procedentes de la producción de DNEG sobre los parámetros medidos en el medio de cultivo.

Agua	Biomasa (g L^{-1})	Nitrato (mM)		Nitrito (mM)	Glicerol (g L^{-1})
		Inicial	Final		
Desionizada	4,9	22	0,4	0	0,04
Subterránea	5,8	28	0,6	0	0,03

Klebsiella oxytoca CECT 4460 se cultivó en el reactor de 40 L en medio mínimo, utilizando para su preparación los distintos tipos de aguas dadas en la tabla. Los parámetros fueron medidos a las 24 horas del ensayo. Las condiciones operacionales fueron las dadas en el texto.

1.2. EFECTO DE LA DISMINUCION DE NUTRIENTES EN EL MEDIO DE CULTIVO SOBRE LA ELIMINACION DE NITRATO EN UNA PLANTA PILOTO DE 40 L DE CAPACIDAD

Para establecer la validez de los datos obtenidos en el reactor de 2 L, en particular a la disminución en la concentración de los nutrientes suministrados al medio de cultivo, se ensayó la reducción simultánea de los mismos en la planta piloto. El ensayo se realizó de acuerdo con los resultados obtenidos a escala de laboratorio en el fermentador de 2 L, reduciéndose los nutrientes entre 1/2 y 1/100 con respecto a la concentración standard dada en la Sección de Materiales y Métodos. La concentración de nitrato, procedente de las aguas del Canal V en las que se elimina el exceso de nitrato de la producción de DNEG, se ajustó a 20 mM y el glicerol se suministró como única fuente de carbono a una concentración de 10 g L⁻¹.

El ensayo realizado utilizando *Klebsiella oxytoca* CECT 4460 fue de la siguiente forma: se utilizó un medio modificado en el cual el fosfato se redujo a una concentración de 0,8 mM, el SO₄Mg se redujo 1/4, la concentración de hierro (6 mg L⁻¹) se redujo 1/10, y los micronutrientes fueron reducidos 1/50 con respecto a las concentraciones standard dadas en Materiales y Métodos. En la Tabla 24 se comparan los datos obtenidos en el medio de cultivo standard y el modificado, observándose que no existen diferencias significativas en los parámetros medidos en cada uno de los medios de cultivo.

En la Figura 18 se detalla el crecimiento y la eliminación de nitrato por *Klebsiella oxytoca* CECT 4460 en este medio modificado. El cultivo alcanzó una alta turbidez, obteniéndose a las 24 horas del ensayo una biomasa de 6,5 g L⁻¹. El 98% del nitrato fue consumido en 24 horas sin acumulación de nitrito ni de amoniaco en el medio de cultivo. Estos resultados fueron similares a los obtenidos cuando los nutrientes fueron suministrados a la concentración standard definida en Materiales y Métodos, y establecieron como válidos los resultados obtenidos en el reactor de 2 L.

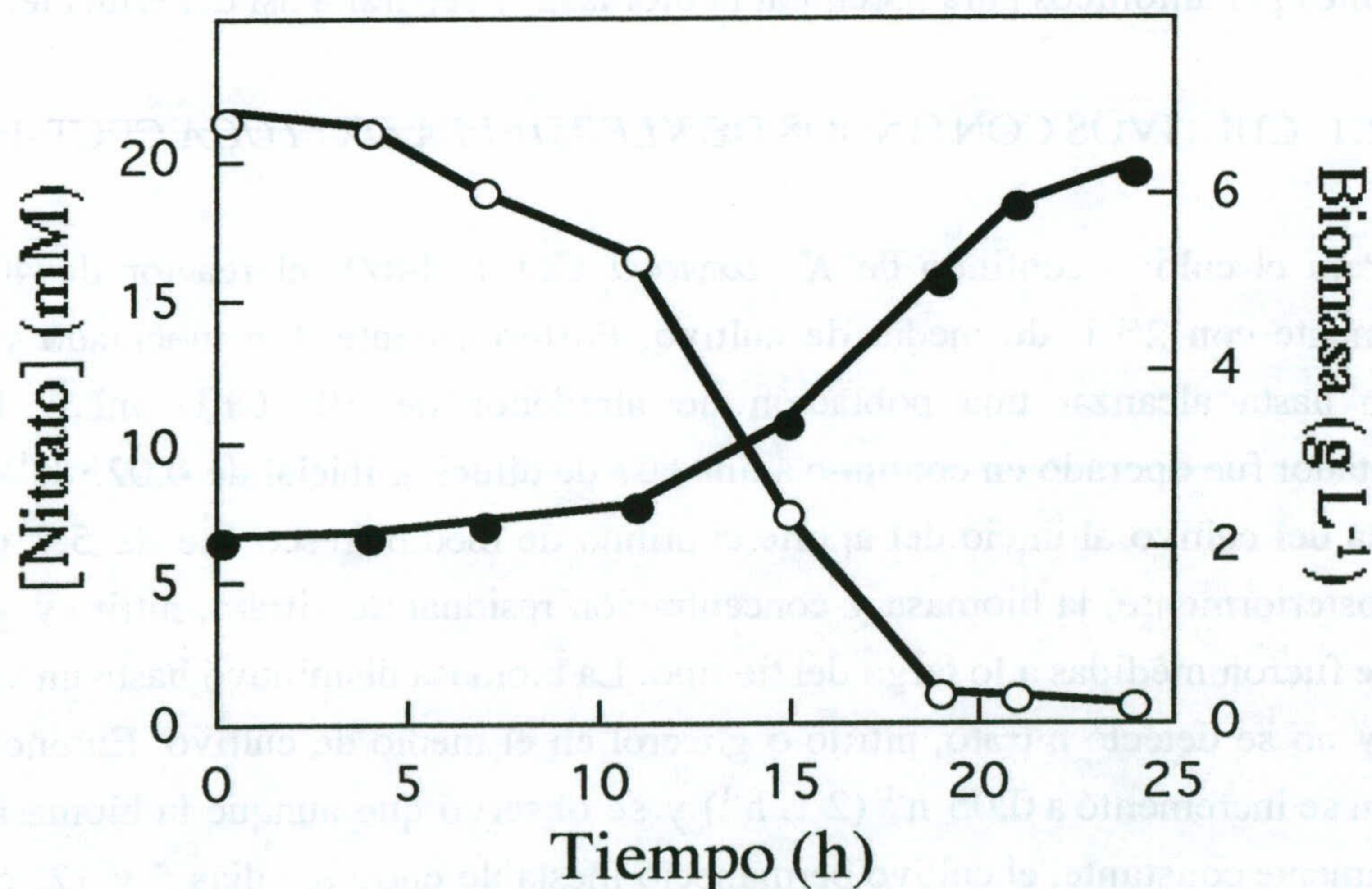
Ensayos realizados utilizando *Arthrobacter globiformis* CECT 4500 mostraron resultados similares a los obtenidos a escala de laboratorio (datos no mostrados), y establecieron los datos previamente obtenidos en el fermentador de 2 L, donde el fosfato se redujo a una concentración de 0,8 mM, y micronutrientes, hierro, y SO₄Mg se suministraron a 1/2 de la concentración standar dada en el apartado de Materiales y Métodos.

Tabla 24. Efecto de la disminución de nutrientes en el medio de cultivo sobre los parámetros medidos en un cultivo de *K. oxytoca* CECT 4460.

Medio	Biomasa (g L ⁻¹)	Nitrate (mM)		Nitrite (mM)	Glycerol (g L ⁻¹)
		Initial	Final		
Standard	5,8	28	0,6	0	0,03
Modificado	6,5	25	0,6	0	0,01

Klebsiella oxytoca CECT 4460 se cultivó en el reactor de 40 L en el medio mínimo indicado. Los parámetros fueron medidos a las 24 horas del ensayo. Las condiciones operacionales fueron las dadas en el texto.

Figura 18. Efecto de la reducción múltiple de nutrientes en el medio de cultivo sobre la eliminación de nitrato por *Klebsiella oxytoca* CECT 4460 en un reactor de 40 L de capacidad.



Klebsiella oxytoca CECT 4460 se cultivó en un reactor de 40 L de capacidad. Las condiciones operacionales fueron: temperatura, 25-30°C; pH, 7; agitación, 350 rpm; el aire fue suministrado a una tasa de 0,3 L por L de cultivo por minuto. La biomasa del cultivo (o), y la concentración de nitrato (o) fueron determinados a lo largo del tiempo.

2. ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS CONTINUOS EN LA PLANTA PILOTO DE 40 L DE CAPACIDAD

El reactor de 40 L fue utilizado para el establecimiento de cultivos continuos en fábrica. El sistema fue diseñado y operado en continuo de la siguiente forma (Figura 19): debido al gran volumen a manejar, el medio de cultivo fue preparado en tres reservorios diferentes. Las aguas residuales procedentes de la producción de dinitroetilenglicol, conteniendo alrededor de 400 mM de NO_3^- , fueron diluidas con aguas subterráneas procedentes del pozo EBUIII en un reservorio de 1 m³ de capacidad (Fig. 2). El fosfato y los micronutrientes fueron preparados en un reservorio de 45 L de capacidad. La fuente de carbono fue preparada independientemente en otro reservorio de 45 L de capacidad, utilizándose como fuente de carbono 20 g L⁻¹ de glicerol para *K. oxytoca* CECT 4460 y 20 g L⁻¹ de etilenglicol para *A. globiformis* CECT 4500.

El contenido de estos tres reservorios fue introducido en el fermentador de 40 L a través de tres bombas peristálticas, de manera que los tres circuitos confluían en un solo canal de entrada en el reactor donde se mezclaban los nutrientes. El control automático de pH se mantuvo mediante la adición de 3,5 M NaOH y 3,5 M de H₂SO₄, preparados en dos reservorios de 25 L de capacidad (Fig. 2). El volumen del cultivo en el fermentador se mantuvo por un sistema en sifón, mediante el cual el exceso de cultivo era expulsado a otro reservorio de 50 L de capacidad; en este segundo reservorio, el efluente era tratado con floculantes polianiónicos para precipitar la biomasa, y separarla así del efluente.

2.1. CULTIVOS CONTINUOS DE *KLEBSIELLA OXYTOCA* CECT 4460

Para el cultivo continuo de *K. oxytoca* CECT 4460, el reactor de 40 L se llenó previamente con 25 L de medio de cultivo. Posteriormente, fue inoculado y operado en estanco hasta alcanzar una población de alrededor de 10⁵ CFU mL⁻¹. Entonces, el fermentador fue operado en continuo a una tasa de dilución inicial de 0,025 h⁻¹ (1 L h⁻¹). La biomasa del cultivo al inicio del aporte continuo de medio fresco fue de 5,7 g L⁻¹ (Figura 20). Posteriormente, la biomasa y concentración residual de nitrato, nitrito y glicerol en el efluente fueron medidas a lo largo del tiempo. La biomasa disminuyó hasta un valor de 4,5 g L⁻¹, y no se detectó nitrato, nitrito o glicerol en el medio de cultivo. Entonces, la tasa de dilución se incrementó a 0,05 h⁻¹ (2 L h⁻¹) y se observó que aunque la biomasa permaneció relativamente constante, el cultivo permaneció inestable entre los días 5 y 12, observándose una acumulación transitoria de nitrato y nitrito en el medio de cultivo. Una vez alcanzadas las condiciones de estado-estacionario, el nivel de nitrato en el efluente fue inferior a 1 mM (Figura 20), el nivel de nitrito fue inferior a 1 μM, y el nivel de carbono estuvo por debajo de 50 mg L⁻¹. Cuando se incrementó la tasa de dilución a 0,1 h⁻¹ (4 L h⁻¹) no se observaron efectos significativos sobre los parámetros antes mencionados (Figura 20). De esta forma la

planta piloto fue operada en continuo satisfactoriamente con la utilización de *K. oxytoca* CECT 4460.

Dado que las bacterias recuperadas en el efluente conservaban todas sus propiedades con respecto a la tolerancia a nitrato y la eliminación del mismo, el funcionamiento del proceso en continuo se predijo satisfactorio por largos periodos de tiempo con esta cepa.

2.2. CULTIVO CONTINUO DE *ARTHROBACTER GLOBIFORMIS* CECT 4500

Para el cultivo continuo de *A. globiformis* CECT 4500 se procedió de igual forma que en el apartado 2.1. para el cultivo de *K. oxytoca* CECT 4460. El reactor fue operado en continuo a una tasa de dilución inicial de $0,025 \text{ h}^{-1}$ (1 L h^{-1}). La biomasa del cultivo sufrió cambios significativos a lo largo del tiempo hasta alcanzar las condiciones de estado-estacionario. A los 3 días del inicio del cultivo continuo se alcanzó un valor máximo de $8,5 \text{ g L}^{-1}$ de biomasa (Figura 21). Posteriormente, la biomasa disminuyó hasta un valor de $3,5 \text{ g L}^{-1}$, y no se detectó nitrato o nitrito en el medio de cultivo en condiciones de estado-estacionario. Entonces, la tasa de dilución se incrementó a $0,0375 \text{ h}^{-1}$ ($1,5 \text{ L h}^{-1}$) (Figura 21). La biomasa del cultivo en el estado-estacionario se mantuvo relativamente constante entre 3 y 4 g L^{-1} . El nivel de nitrato en el efluente se mantuvo por debajo de 1 mM y el nivel de nitrito fue inferior a $1 \mu\text{M}$ (Figura 21).

La disminución en los valores de la medida de la biomasa se debió a la tendencia de *A. globiformis* CECT 4500 de formar micelio cuando se expuso a nitrato (ver capítulo 1). Dado que las bacterias recuperadas en el efluente conservaban todas sus propiedades con respecto a la tolerancia a nitrato y la eliminación del mismo, el funcionamiento del proceso en continuo se predijo satisfactorio por largos periodos de tiempo con esta cepa.

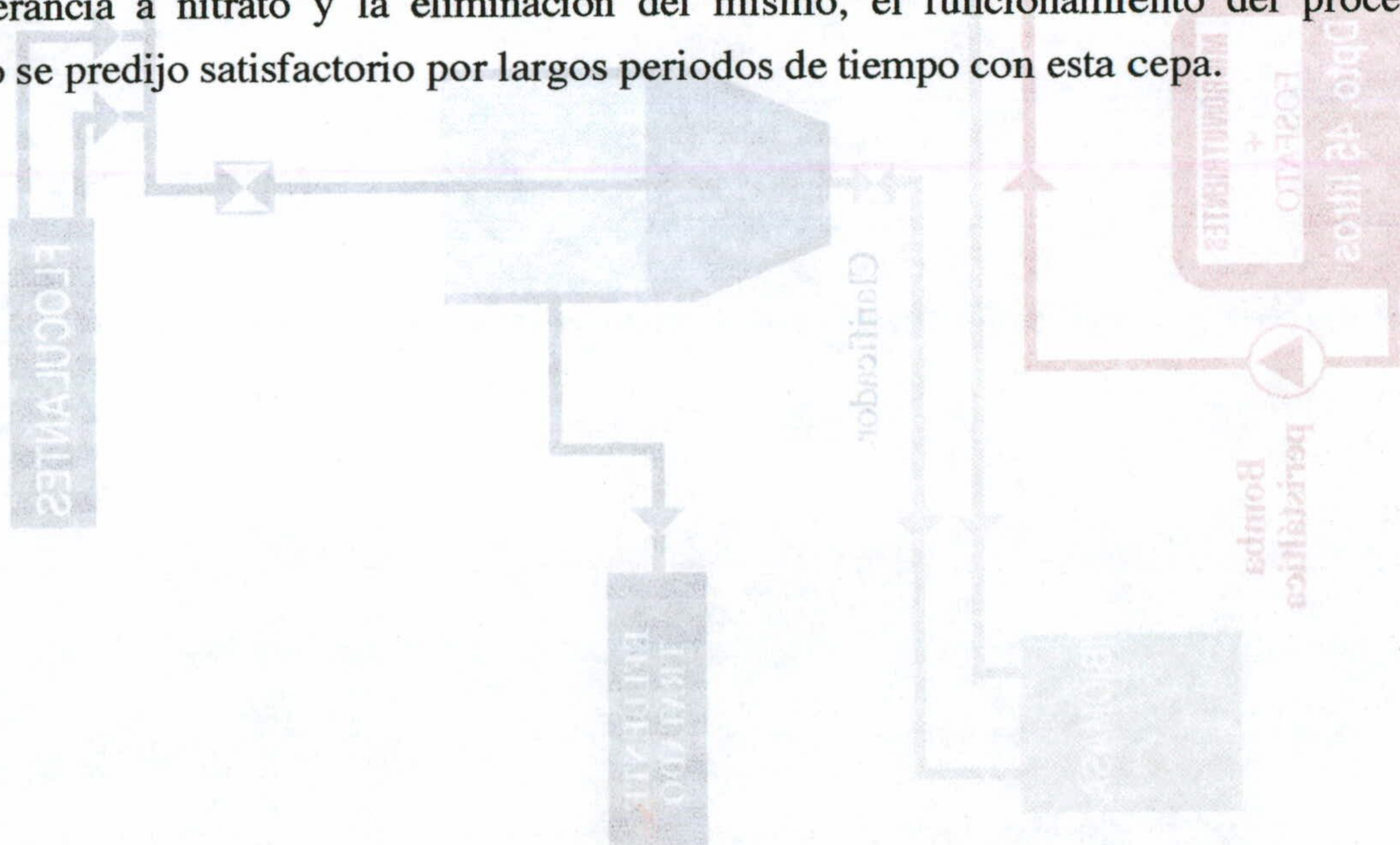


Figura 2. Esquema del sistema continuo operado en la planta piloto de 40 L de capacidad.

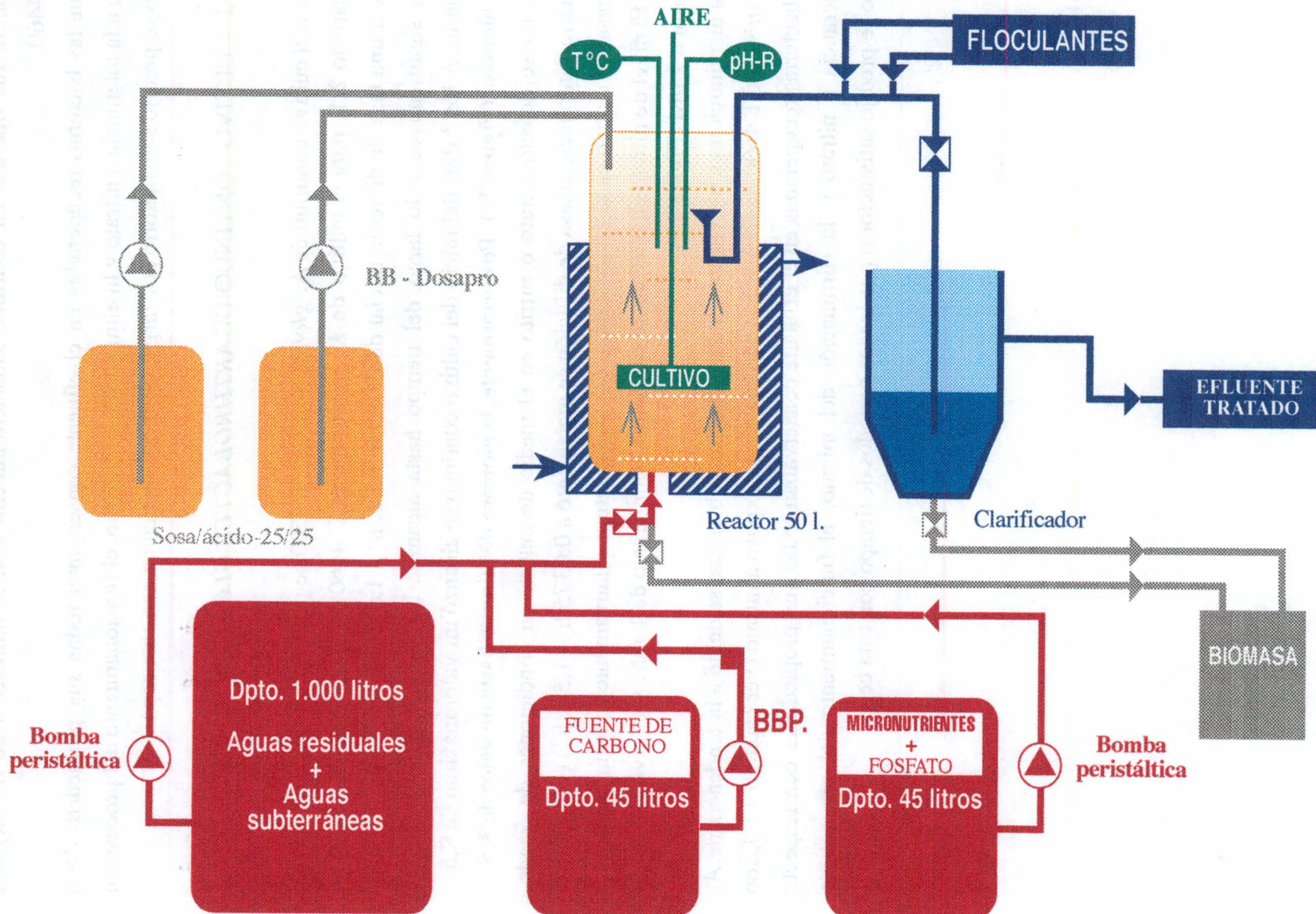
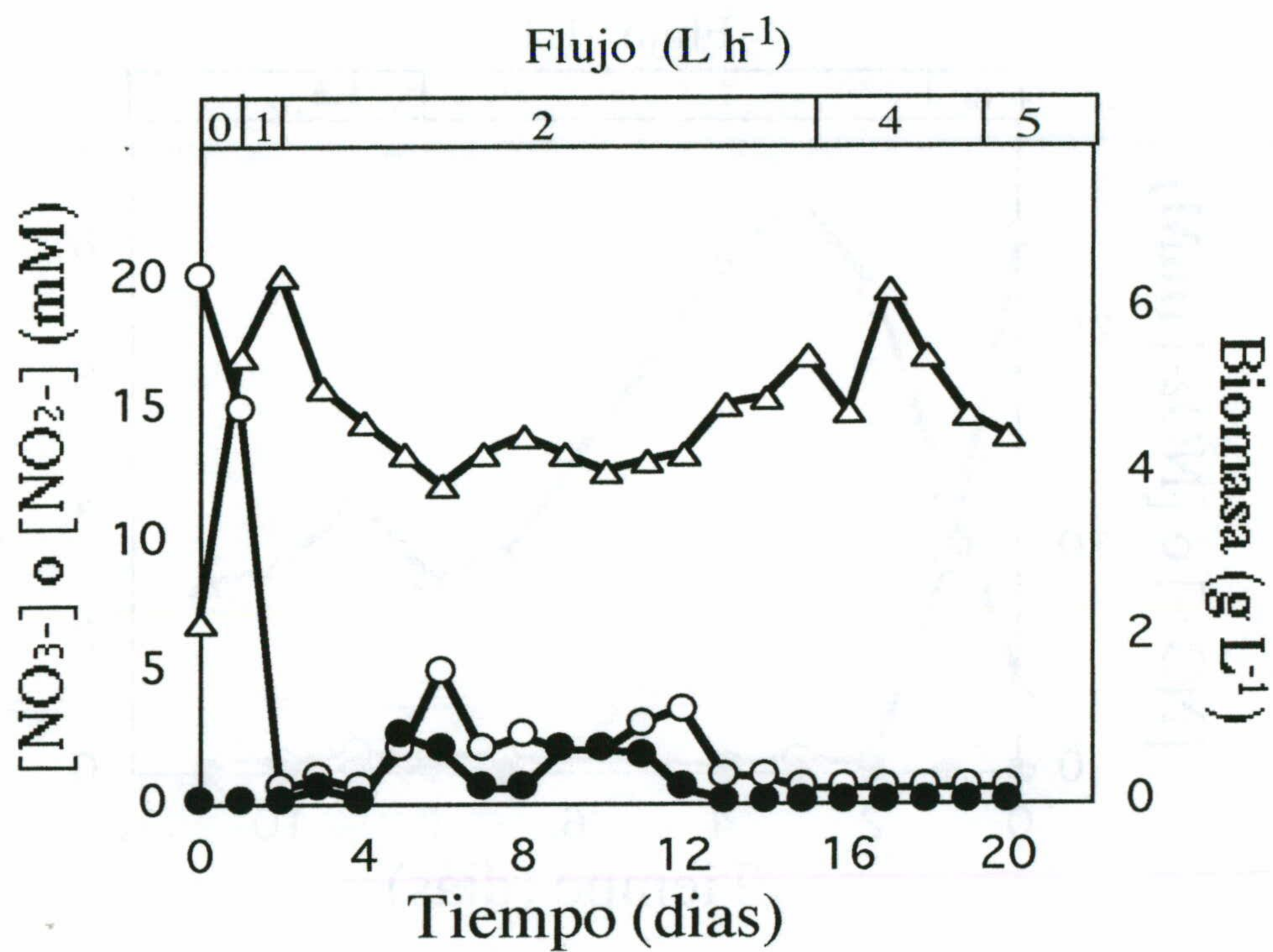
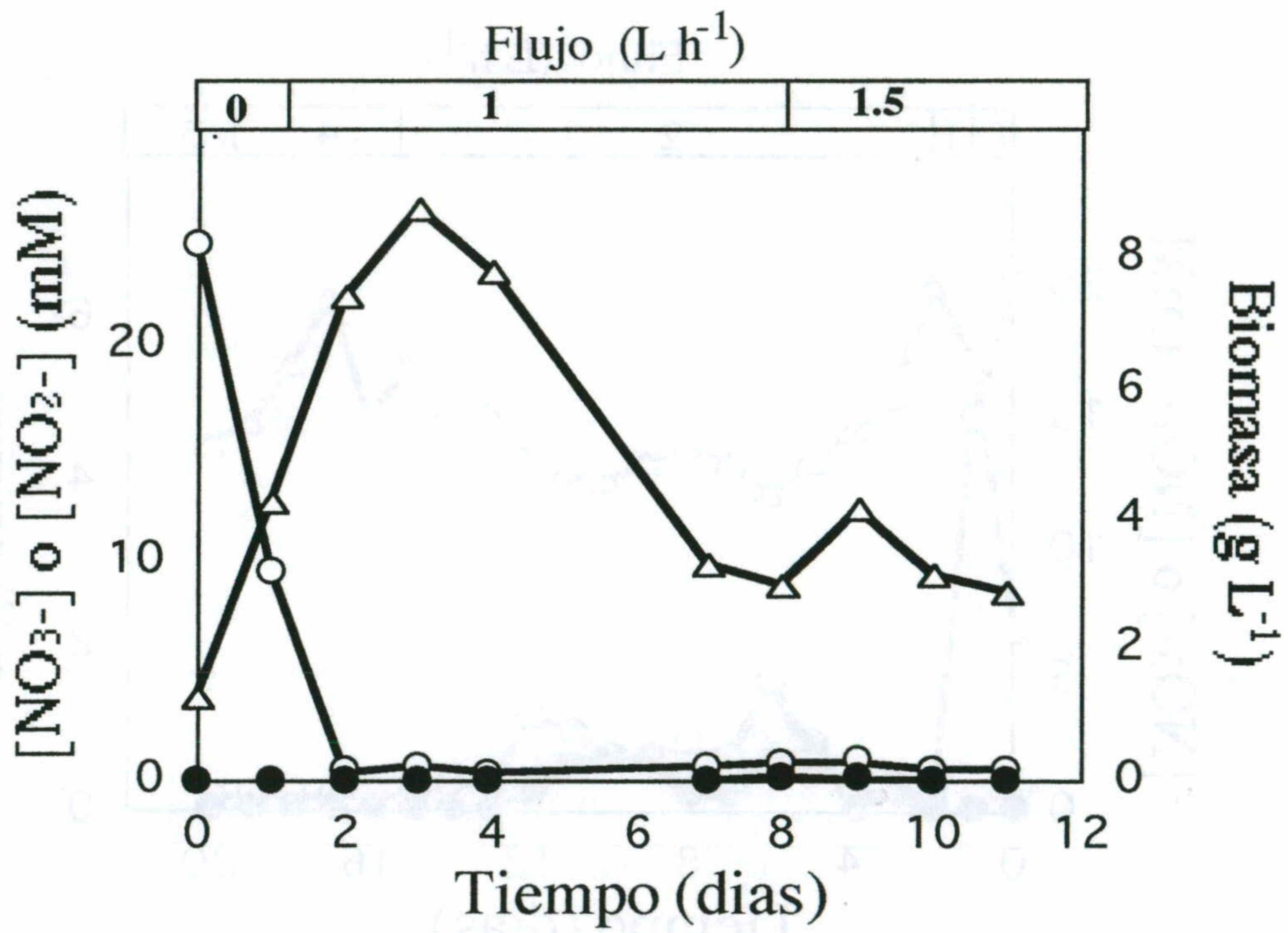


Figura 20. Eliminación de nitrato por *Klebsiella oxytoca* CECT 4460 en un cultivo continuo de 40 L de capacidad.



Klebsiella oxytoca CECT 4460 se cultivó en continuo en un fermentador de 40 L de capacidad. Las condiciones operacionales fueron las mismas que para la Figura 1. El fermentador fue alimentado a una tasa (L h⁻¹) indicada en la cabecera de la figura. La concentración de nitrato (○), nitrito (●) y la biomasa (Δ), fueron determinados diariamente.

Figura 21. Eliminación de nitrato por *Arthrobacter globiformis* CECT 4500 en un cultivo conti nuo de 40 L de capacidad.



Las condiciones operacionales son las mismas que las indicadas en la leyenda de la Figura 20.

III. INFLUENCIA DE LA FUENTE DE CARBONO SOBRE LA ELIMINACION DE NITRATO EN CULTIVOS ESTANCOS Y CONTINUOS DE *KLEBSIELLA OXYTOCA* CECT 4460

Resumen

En este capítulo se estudia la influencia de la fuente de carbono, glicerol y/o sacarosa, sobre la tasa de crecimiento de *Klebsiella oxytoca* CECT 4460, y su efecto sobre el proceso de eliminación de nitrato por esta cepa en condiciones de laboratorio.

La utilización de sacarosa por esta cepa fue constitutiva, mientras que la utilización de glicerol fue regulable. En cultivos estancos con mezclas de sacarosa y glicerol como fuente de carbono, se observó consumo secuencial de ambas fuentes de carbono, siendo el consumo de sacarosa preferente sobre el de glicerol.

Por el contrario, *K. oxytoca* CECT 4460 fue capaz de utilizar simultáneamente ambas fuentes de carbono en cultivos continuos. Esta cepa eliminó el 99% del nitrato suministrado en el medio de cultivo, sin acumulación de nitrito o amonio, utilizando sacarosa, glicerol, o mezclas de ambas fuentes de carbono en quimiostatos. El rendimiento y la eficiencia en la utilización de C y N fueron determinadas a diferentes tasas de dilución. Los resultados obtenidos indicaron que a tasas de dilución de entre 0,05 y 0,2 h⁻¹ más del 99% del C y del N suministrados fueron eliminados del medio.

Dentro de esta serie de estudios se determinó, a diferentes tasas de dilución, la zona de doble limitación de nutrientes del crecimiento por sacarosa y nitrato. Los resultados obtenidos indicaron que a una tasa de dilución de 0,1 h⁻¹ y para razones C:N de entre 10 y 30, el proceso se llevó a cabo con una eficiente eliminación de ambos nutrientes (99%). Para una tasa de dilución de 0,2 h⁻¹, la eliminación eficiente de nitrato y sacarosa se obtuvo en el intervalo de razón C/N de entre 8 y 11. Estas condiciones se consideraron aceptables para el vertido final de las aguas residuales resultantes de la síntesis de DNEG.

1. CULTIVOS ESTANCOS

El glicerol fue elegido en esta serie de ensayos porque fue la fuente de carbono utilizada en el aislamiento de la cepa como se describió en el capítulo 1. Entre los azúcares utilizados por *K. oxytoca* CECT 4460 como fuente de carbono (sacarosa, glucosa, lactosa, fructosa y galactosa), la sacarosa se eligió por su bajo coste económico, y a su presencia en cantidades superiores al 50% (p/p) en residuos agrícolas como melazas de caña de azúcar y remolacha. Ello hizo que la sacarosa se considerara como una fuente de carbono alternativa económicamente interesante para el tratamiento de efluentes con altas concentraciones de nitrato.

1.1. DETERMINACION DE LA TASA MAXIMA DE CRECIMIENTO EN CULTIVOS ESTANCOS DE *KLEBSIELLA OXYTOCA* CECT 4460

Con objeto de establecer los límites de la tasa de dilución a utilizar en los cultivos continuos de *K. oxytoca* CECT 4460, se determinó la tasa máxima de crecimiento (μ_{\max}) en cultivos estancos. Las células fueron cultivadas en medio mínimo con 20 mM de nitrato, y 0,5-4 g L⁻¹ de C procedente de glicerol (C-glicerol) o de sacarosa (C-sacarosa). Las células se mantuvieron mediante sucesivos pases en este mismo medio en la fase exponencial de crecimiento durante 35 generaciones, siendo utilizadas posteriormente para la determinación de la μ_{\max} . Las células cultivadas en glicerol como única fuente de carbono mostraron una μ_{\max} de 0,46±0,01 h⁻¹, y las células cultivadas en sacarosa como única fuente de carbono mostraron una μ_{\max} de 0,3±0,01 h⁻¹.

1.2. CRECIMIENTO DE *KLEBSIELLA OXYTOCA* CECT 4460 EN CULTIVOS ESTANCOS CON MEZCLAS DE SACAROSA Y GLICEROL COMO FUENTE DE CARBONO.

Es un hecho bien establecido que las condiciones de cultivo influyen el patrón de utilización de distintas fuentes de carbono cuando se utilizan mezclas de diferentes fuentes de carbono (Wanner y Egli, 1990). En este caso, el fenómeno conocido como represión catabólica es uno de los principales mecanismos responsables de la utilización preferencial de una determinada fuente de carbono (Magasanik, 1970; Duetz *et al.*, 1994; Egli, 1995).

Klebsiella oxytoca CECT 4460 fue precultivada en quimiostatos (D=0.2 h⁻¹) en los que se utilizó como única fuente de carbono glicerol o sacarosa. Estas células fueron usadas como inóculo de cultivos estancos, los cuales se realizaron en medio mínimo con 20 mM de nitrato y como fuente de carbono una mezcla de glicerol y sacarosa (1:1). Los resultados obtenidos se muestran en las Figuras 22 y 23.

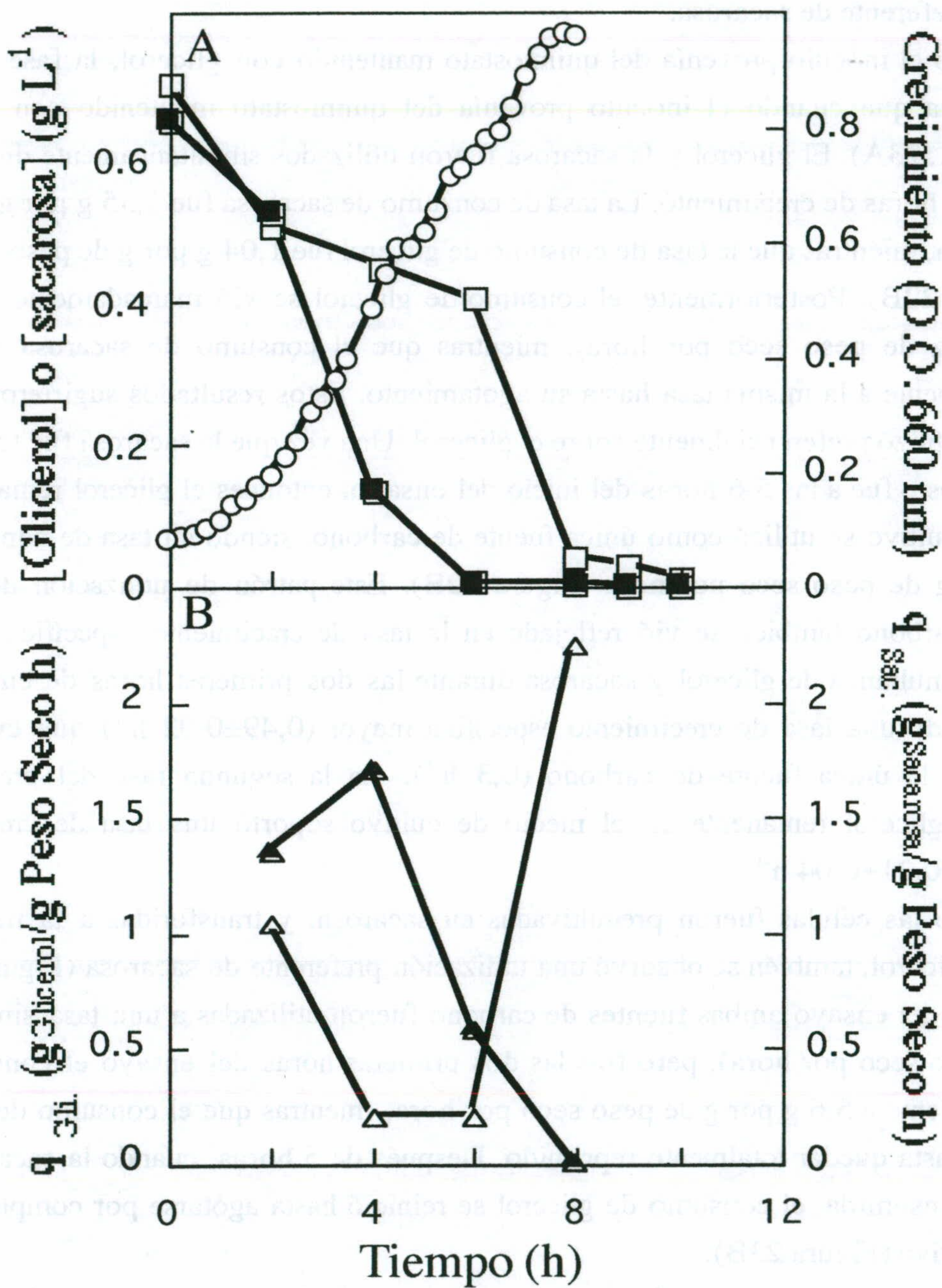
Independientemente de la fuente de carbono utilizada para cultivar *K. oxytoca* CECT 4460, las células expuestas a una mezcla de glicerol y sacarosa mostraron una curva de crecimiento diáuxico. En ambos casos, sacarosa y glicerol fueron usados simultáneamente durante las dos primeras horas del ensayo, posteriormente el consumo fue secuencial con utilización preferente de sacarosa.

Cuando el inóculo provenía del quimiostato mantenido con glicerol, la fase diáuxica fue más corta que cuando el inóculo provenía del quimiostato mantenido con sacarosa (Figuras 22A, 23A). El glicerol y la sacarosa fueron utilizados simultáneamente durante las dos primeras horas de crecimiento. La tasa de consumo de sacarosa fue 1,35 g por g de peso seco por hora, mientras que la tasa de consumo de glicerol fue 1,04 g por g de peso seco por hora (Figura 22B). Posteriormente, el consumo de glicerol se vió marcadamente reducido (0,2 g por g de peso seco por hora), mientras que el consumo de sacarosa continuó aproximadamente a la misma tasa hasta su agotamiento. Estos resultados sugirieron que la sacarosa se utilizó preferencialmente sobre el glicerol. Una vez que la sacarosa fue totalmente consumida, esto fue a las 5-6 horas del inicio del ensayo, entonces el glicerol remanente en el medio de cultivo se utilizó como única fuente de carbono, siendo su tasa de consumo de 2,25 g por g de peso seco por hora (Figura 22B). Este patrón de utilización de ambas fuentes de carbono también se vió reflejado en la tasa de crecimiento específica (μ). La utilización simultánea de glicerol y sacarosa durante las dos primeras horas de cultivo dió como resultado una tasa de crecimiento específica mayor ($0,49 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$) que cuando la sacarosa fue la única fuente de carbono ($0,3 \text{ h}^{-1}$). En la segunda fase del crecimiento diáuxico, el glicerol remanente en el medio de cultivo soportó una tasa de crecimiento específica de $0,21 \pm 0,04 \text{ h}^{-1}$.

Cuando las células fueron precultivadas en sacarosa, y transferidas a la mezcla de sacarosa y glicerol, también se observó una utilización preferente de sacarosa (Figura 23A). Al comienzo del ensayo ambas fuentes de carbono fueron utilizadas a una tasa similar (3g por g de peso seco por hora), pero tras las dos primeras horas del ensayo el consumo de sacarosa aumentó a 5,6 g por g de peso seco por hora, mientras que el consumo de glicerol disminuyó hasta quedar totalmente reprimido. Después de 5 horas, cuando la sacarosa fue totalmente consumida, el consumo de glicerol se reinició hasta agotarse por completo en el medio de cultivo (Figura 23B).

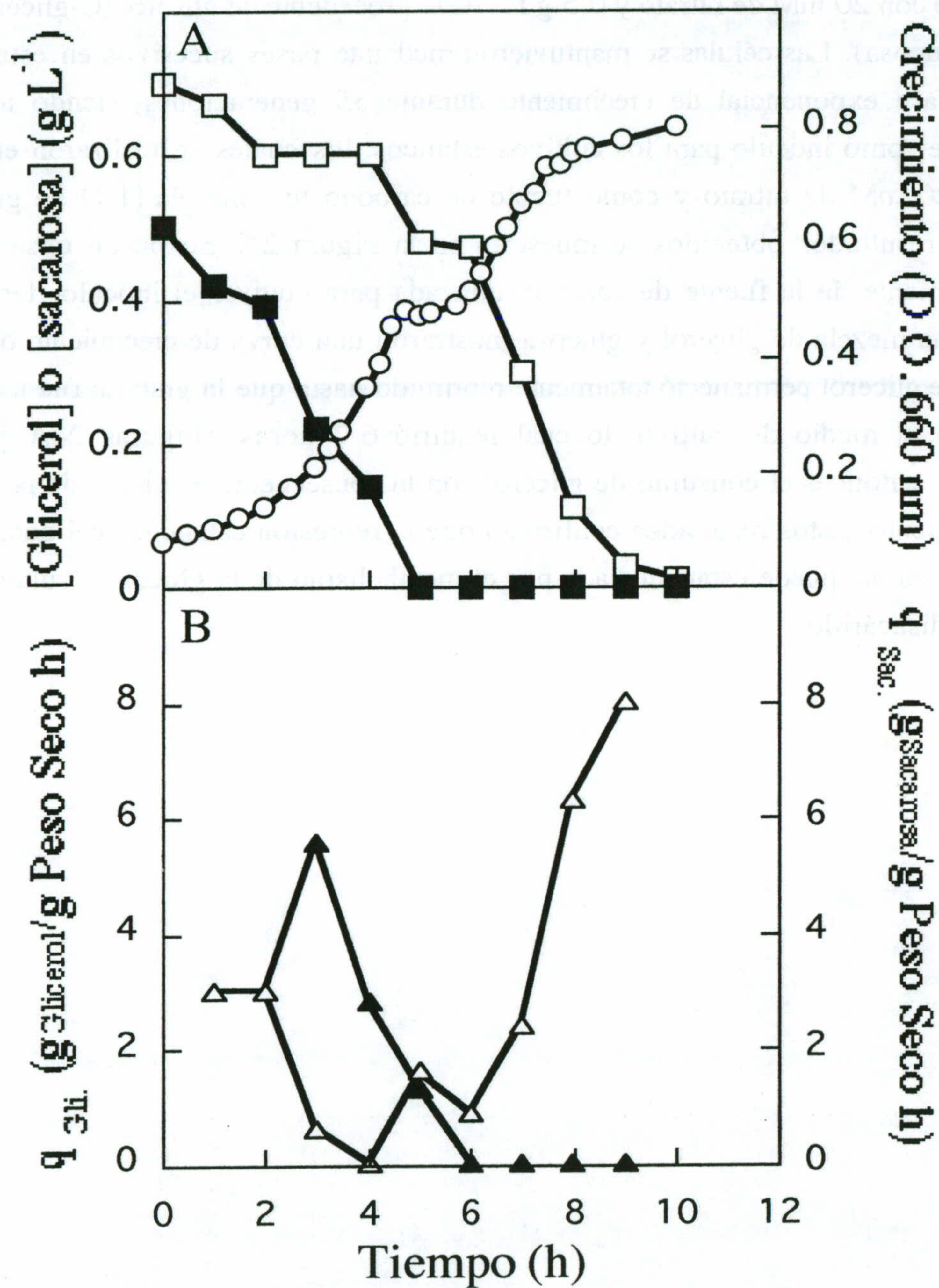
En vista de este comportamiento, se consideró la siguiente hipótesis, a saber, que la glucosa que se genera por hidrólisis de sacarosa podría provocar la represión catabólica del consumo de glicerol debido a la presencia de glucosa en el medio de cultivo.

Figura 22. Crecimiento de células de *Klebsiella oxytoca* CECT 4460, precultivadas en glicerol, en cultivos estancos con una mezcla de sacarosa y glicerol (1:1) como fuente de carbono.



Células de *Klebsiella oxytoca* CECT 4460 se precultivaron en un quimiostato con glicerol a $D=0,2 \text{ h}^{-1}$, y se transfirieron a un cultivo estanco con una mezcla de glicerol y sacarosa (1:1) como fuente de carbono. El crecimiento (o) y la concentración de sacarosa (■) y glicerol (□) fueron determinados a los tiempos indicados (Panel A). La tasa de consumo específico de glicerol (Δ) y sacarosa (Δ) se determinaron a los tiempos indicados (Panel B).

Figura 23. Crecimiento de células de *Klebsiella oxytoca* CECT 4460, precultivadas en sacarosa, en cultivos estancos con una mezcla de sacarosa y glicerol (1:1) como fuente de carbono.



Células de *Klebsiella oxytoca* CECT 4460 se precultivaron en un quimiostato con sacarosa a $D=0,2 \text{ h}^{-1}$, y se transfirieron a un cultivo estanco con una mezcla de glicerol y sacarosa (1:1) como fuente de carbono. El crecimiento (o) y la concentración de sacarosa (■) y glicerol (□) fueron determinados a los tiempos indicados (Panel A). La tasa de consumo específico de glicerol (Δ) y sacarosa (Δ) se determinaron a los tiempos indicados (Panel B).

1.3. CRECIMIENTO DE *KLEBSIELLA OXYTOCA* CECT 4460 EN CULTIVOS ESTANCOS CON UNA MEZCLA DE GLUCOSA Y GLICEROL (1:1) COMO FUENTE DE CARBONO.

Klebsiella oxytoca CECT 4460 se precultivó en cultivos estancos en los que se utilizó medio mínimo con 20 mM de nitrato y 0,5 g L⁻¹ de C procedente de glicerol (C-glicerol) o de glucosa (C-glucosa). Las células se mantuvieron mediante pases sucesivos en este mismo medio en la fase exponencial de crecimiento durante 35 generaciones, siendo utilizadas posteriormente como inóculo para los cultivos estancos, los cuales se realizaron en medio mínimo con 20 mM de nitrato y como fuente de carbono una mezcla (1:1) de glicerol y glucosa. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 24. Se puede observar que independientemente de la fuente de carbono utilizada para cultivar el inóculo, las células expuestas a una mezcla de glicerol y glucosa mostraron una curva de crecimiento diáuxico. El consumo de glicerol permaneció totalmente reprimido hasta que la glucosa fue totalmente consumida en el medio de cultivo, lo cual requirió 6-7 horas. (Figuras 24A y 24B), produciéndose entonces el consumo de glicerol con la consecuente aparición de la segunda fase de crecimiento. Estos resultados confirman que la represión catabólica del consumo de glicerol por sacarosa puede estar mediada por el metabolismo de la glucosa resultante de la hidrólisis del disacárido.

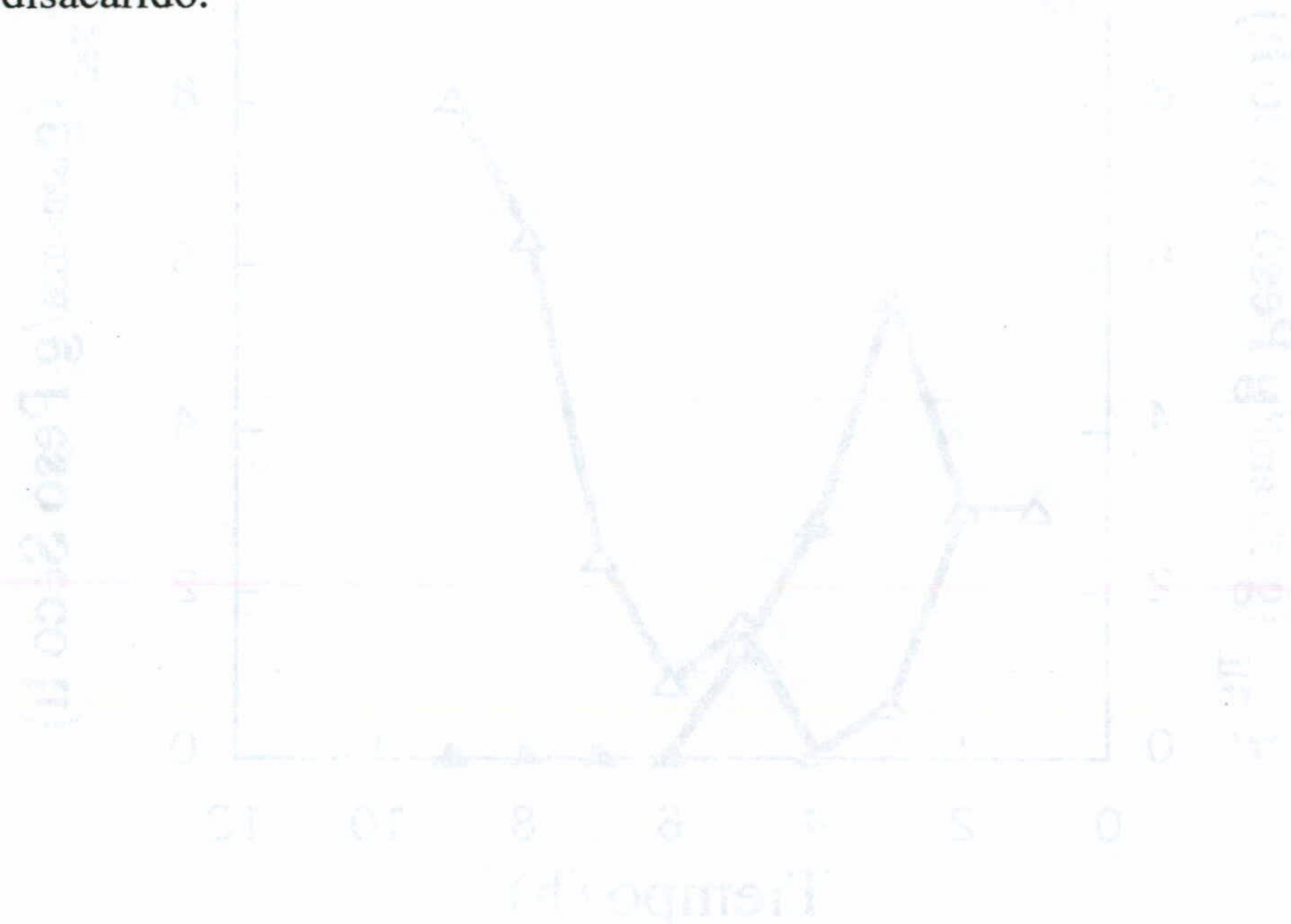
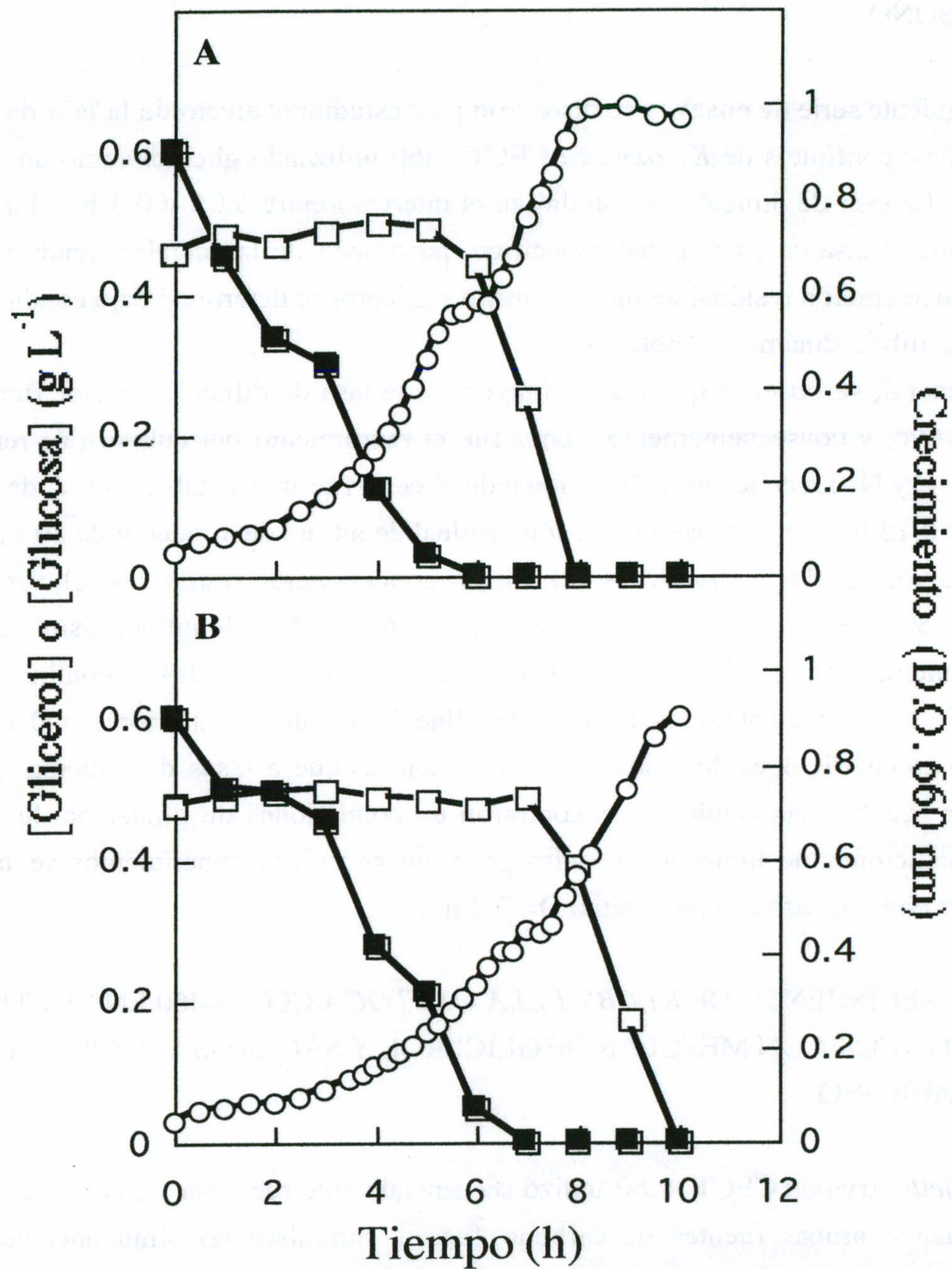


Figura 24. Crecimiento de células de *Klebsiella oxytoca* CECT 4460 en cultivos estancos con una mezcla de glucosa y glicerol (1:1) como fuente de carbono.



Células de *Klebsiella oxytoca* CECT 4460 se precultivaron durante 35 generaciones con glicerol como única fuente de carbono, entonces una alícuota se transfirió a un medio de cultivo con una mezcla de glicerol y glucosa (1:1) como fuente de carbono. El crecimiento (o) y la concentración de glucosa (■) y glicerol (□) fueron determinados a los tiempos indicados (Panel A). El Panel B muestra los resultados cuando las células se precultivaron con glucosa como única fuente de carbono. Otros detalles como en el Panel A.

2. CULTIVOS CONTINUOS

2.1. CINETICA DE CRECIMIENTO DE *KLEBSIELLA OXYTOCA* CECT 4460 EN CULTIVOS CONTINUOS UTILIZANDO GLICEROL COMO UNICA FUENTE DE CARBONO

La siguiente serie de ensayos se diseñaron para estudiar el efecto de la tasa de dilución (D) en cultivos continuos de *K. oxytoca* CECT 4460 utilizando glicerol como única fuente de carbono. La tasa de dilución se estudió en el intervalo entre 0,05 y 0,3 h⁻¹. La relación existente entre la tasa de crecimiento específico, peso seco de las células, rendimiento del cultivo y concentración residual de nitrato, nitrito y glicerol se determinó bajo condiciones de estado de equilibrio dinámico (Tabla 25).

En general, se observó que cuanto mayor fue la tasa de dilución, menor fue el peso seco del cultivo, y consecuentemente menor fue el rendimiento del cultivo (Y) referido al consumo de C y N. La concentración residual de glicerol fue indetectable a tasas de dilución entre 0,05 y 0,15 h⁻¹, con una concentración residual de nitrato de alrededor de 20 mg L⁻¹. A tasas de dilución iguales o superiores a 0,2 h⁻¹ la concentración residual de glicerol fue de alrededor de 500 mg L⁻¹, mientras que la concentración residual de nitrato disminuyó hasta aproximadamente 10 mg L⁻¹. Estos resultados sugieren que los cultivos continuos de *K. oxytoca* CECT 4460 mantenidos a tasas de dilución iguales o inferiores a 0,15 h⁻¹ se encontraron en condiciones de limitación de C, mientras que a tasas de dilución iguales o superiores a 0,2 h⁻¹, las células se encontraron en condiciones de limitación de N. Para asegurar condiciones de limitación de nitrógeno, en sucesivos experimentos se utilizaron quimiostatos con una tasa de crecimiento D= 0,2 h⁻¹.

2.2. CRECIMIENTO DE *KLEBSIELLA OXYTOCA* CECT 4460 EN CULTIVOS CONTINUOS CON MEZCLAS DE GLICEROL Y SACAROSA COMO FUENTE DE CARBONO

Klebsiella oxytoca CECT 4460 utilizó secuencialmente sacarosa y glicerol en cultivos estancos cuando ambas fuentes de carbono fueron suministradas simultáneamente (ver Figuras 22A y 23A). Para comprobar si este comportamiento también se daba en cultivos continuos bajo condiciones de estado de equilibrio dinámico, *K. oxytoca* CECT 4460 se cultivó en un quimiostato a una tasa fija de dilución de 0.2 h⁻¹ y con una concentración de 20 mM de nitrato en el influente. Bajo condiciones de estado de equilibrio dinámico se varió la proporción de sacarosa en la mezcla suministrada como fuente de carbono, siendo la concentración total de carbono (C-glicerol + C-sacarosa) de 3,9 g L⁻¹ (Tabla 26). Para cada razón glicerol/sacarosa, se permitió que el cultivo alcanzase las condiciones de estado de equilibrio dinámico, y entonces se determinaron los diferentes parámetros (peso seco, y

concentración residual de nitrato, glicerol y sacarosa). Se observó que la biomasa de los cultivos determinada como peso seco disminuyó a medida que se incrementó la proporción de sacarosa en las mezclas; consecuentemente también disminuyó el Y_N y el Y_C . Estos resultados sugieren que *K. oxytoca* CECT 4460 utilizaba sacarosa con una menor eficiencia que glicerol. La concentración residual de nitrato en el medio de cultivo fue del orden de 10-20 mg L⁻¹, independientemente de la proporción de sacarosa en la mezcla de carbono. En ningún caso se observó acumulación de nitrito en el medio de cultivo.

También se determinó la concentración residual de glicerol y sacarosa en dichos cultivos. Cuando la razón sacarosa:glicerol en la mezcla fue de 1, la concentración residual de sacarosa fue indetectable, mientras que la de glicerol fue de 470 mg L⁻¹. Una disminución en las mezclas de la proporción de glicerol (con aumento en sacarosa) condujo a que la concentración de glicerol en el medio fuese casi indetectable. Es de destacar que la concentración residual de sacarosa o glicerol a $D=0.2 \text{ h}^{-1}$ fue siempre más baja cuando se suministraron en mezclas que cuando se suministraron independientemente glicerol o sacarosa como única fuente de carbono. Este fenómeno ha sido observado en una gran variedad de microorganismos cultivados en quimiostatos con diferentes mezclas de substratos como fuentes de carbono (Egli *et al.*, 1993; Egli, 1995; Lendenmann *et al.*, 1996), aunque las bases moleculares de esta observación son desconocidas.

Tabla 25. Relación entre la tasa de crecimiento específica (D) y los parámetros medidos en un quimiostato de *K. oxytoca* CECT 4460 mantenido con glicerol y nitrato.

Tasa de crecimiento (h ⁻¹)	Peso Seco (g L ⁻¹)	Y _N (g peso seco/g N)	Y _C (g peso seco/g C)	Concentración Residual de	
				Glicerol (mg L ⁻¹)	Nitrato (mg L ⁻¹)
0,05	5,0	16,3	1,2	2	21,7
0,10	5,3	17,2	1,3	16	20,4
0,15	5,2	16,8	1,2	1	19,2
0,20	4,7	15,2	1,2	500	12,4
0,25	4,7	15,3	1,2	500	9,3
0,30	4,3	14,0	1,1	500	10,5

Klebsiella oxytoca CECT 4460 fue cultivada en un quimiostato hasta alcanzar el estado de equilibrio dinámico a las tasas de dilución indicadas. El peso seco, y la concentración residual de glicerol y nitrato fueron determinados tal y como se indica en Materiales y Métodos. El rendimiento de los cultivos para C y N se expresa en g de peso seco por g de N o C consumido.

Tabla 26. Efecto de la proporción de sacarosa y glicerol en las mezclas utilizadas como fuente de carbono para el cultivo continuo de *Klebsiella oxytoca* a $D=0,2 \text{ h}^{-1}$ sobre el peso seco y utilización del C y N.

Glicerol/Sacarosa (%)	Peso Seco (g L^{-1})	Y_N (g peso seco/g N)	Y_C (g peso seco/g C)	Nitrato (mg L^{-1})	Concentración residual de	
					Glicerol (mg L^{-1})	Sacarosa (mg L^{-1})
100	0	4,7	15,2	12	500	0
50	50	4,7	14,5	8	468	4
25	75	4,4	13,7	16	0	5
15	85	4,3	13,1	14	0	8
10	90	4,1	12,5	13	1	6
0	100	3,8	14,6	20	0	470

Klebsiella oxytoca CECT 4460 fue cultivada en un quimiostato a $D=0,2 \text{ h}^{-1}$, con las mezclas de sacarosa y glicerol que se indican, de manera que el C total (C-glicerol + C-sacarosa) fue $3,9 \text{ g L}^{-1}$, y la concentración inicial de nitrato fue de $1,24 \text{ g L}^{-1}$. Las determinaciones de Y_N , Y_C , peso seco y las concentraciones residuales de nitrato, glicerol y sacarosa se realizaron en cultivos en estado de equilibrio dinámico. Otros detalles como en la leyenda de la Tabla 25.

2.3. CINÉTICA DEL CRECIMIENTO DE *KLEBSIELLA OXYTOCA* CECT 4460 EN CULTIVOS CONTINUOS UTILIZANDO SACAROSA COMO ÚNICA FUENTE DE CARBONO

En cultivos estancos la eliminación de nitrato cuando se utilizó sacarosa como única fuente de carbono, fue tan eficiente como con glicerol; sin embargo, se había observado generalmente acumulación de nitrito en el medio de cultivo (datos no mostrados). Esta situación no se observó en quimiostatos, en los cuales las células se adaptaron progresivamente a sacarosa, tal y como se describió en los ensayos recogidos en la Tabla 26 en los que se incrementó progresivamente la concentración de sacarosa en la mezcla sacarosa/glicerol. Para analizar con más detalle este comportamiento, se estudió el efecto de la tasa de dilución (D) en cultivos continuos de *K. oxytoca* CECT 4460 utilizando sacarosa como única fuente de carbono. La tasa de dilución se ensayó en el intervalo entre 0,05 y 0,25 h^{-1} (Tabla 27). La relación existente entre la tasa de crecimiento específico (D), peso seco de las células, rendimiento del cultivo y concentración residual de nitrato, nitrito y sacarosa se determinó cuando los cultivos habían alcanzado las condiciones de estado de equilibrio dinámico (Tabla 27). Se observó que cuanto mayor fue la tasa de dilución menor fue el peso seco del cultivo. El rendimiento del cultivo para C y N consumido fue relativamente constante, siendo el Y_N entre 14,6 y 15,2 g peso seco/g N consumido, y el Y_C entre 1,03 y 1,1 g peso seco/ g C consumido. La concentración residual de sacarosa fue indetectable a tasas de dilución entre 0,05 y 0,15 h^{-1} , con una concentración residual de nitrato de entre 13 y 22,5 mg L^{-1} . A una tasa de dilución igual a 0,2 h^{-1} la concentración residual de sacarosa fue de alrededor de 470 mg L^{-1} , mientras que la concentración residual de nitrato fue de 20 mg

L^{-1} . Estos resultados sugieren que los cultivos continuos de *K. oxytoca* CECT 4460 mantenidos a tasas de dilución iguales o inferiores a 0,15 h^{-1} se encontraban en condiciones de limitación de C, mientras que a una tasa de dilución igual a 0,2 h^{-1} se encontraban en condiciones de limitación de N. A tasas de dilución superiores a 0,2 h^{-1} se observó que los cultivos se lavaron, probablemente por estar próximos al valor de la tasa máxima de crecimiento con sacarosa ($\mu=0,3\pm 0,01 \text{ h}^{-1}$) como fuente de C, tal y como se determinó en cultivos estancos.

Tabla 27. Relación entre la tasa de crecimiento específica (D) y los parámetros medidos en un quimiostato de *K. oxytoca* CECT 4460 mantenido con sacarosa y nitrato.

Tasa de crecimiento (h ⁻¹)	Peso Seco (g L ⁻¹)	Y _N (g peso seco/g N)	Y _C (g peso seco/g C)	Concentración Residual de	
				Sacarosa (mg L ⁻¹)	Nitrato (mg L ⁻¹)
0,05	4,0	15	1,0	0	13,3
0,10	4,0	15	1,0	0	13
0,15	3,9	15,2	1,0	7,8	22,5
0,20	3,8	14,6	1,1	470	20

Klebsiella oxytoca CECT 4460 fue cultivada en quimiostatos hasta alcanzar el estado de equilibrio dinámico a las tasas de dilución indicadas. El peso seco, y la concentración residual de sacarosa y nitrato fueron determinados tal y como se indica en Materiales y Métodos. El rendimiento de los cultivos para C y N se expresa en g de peso seco por g de N o C consumido.

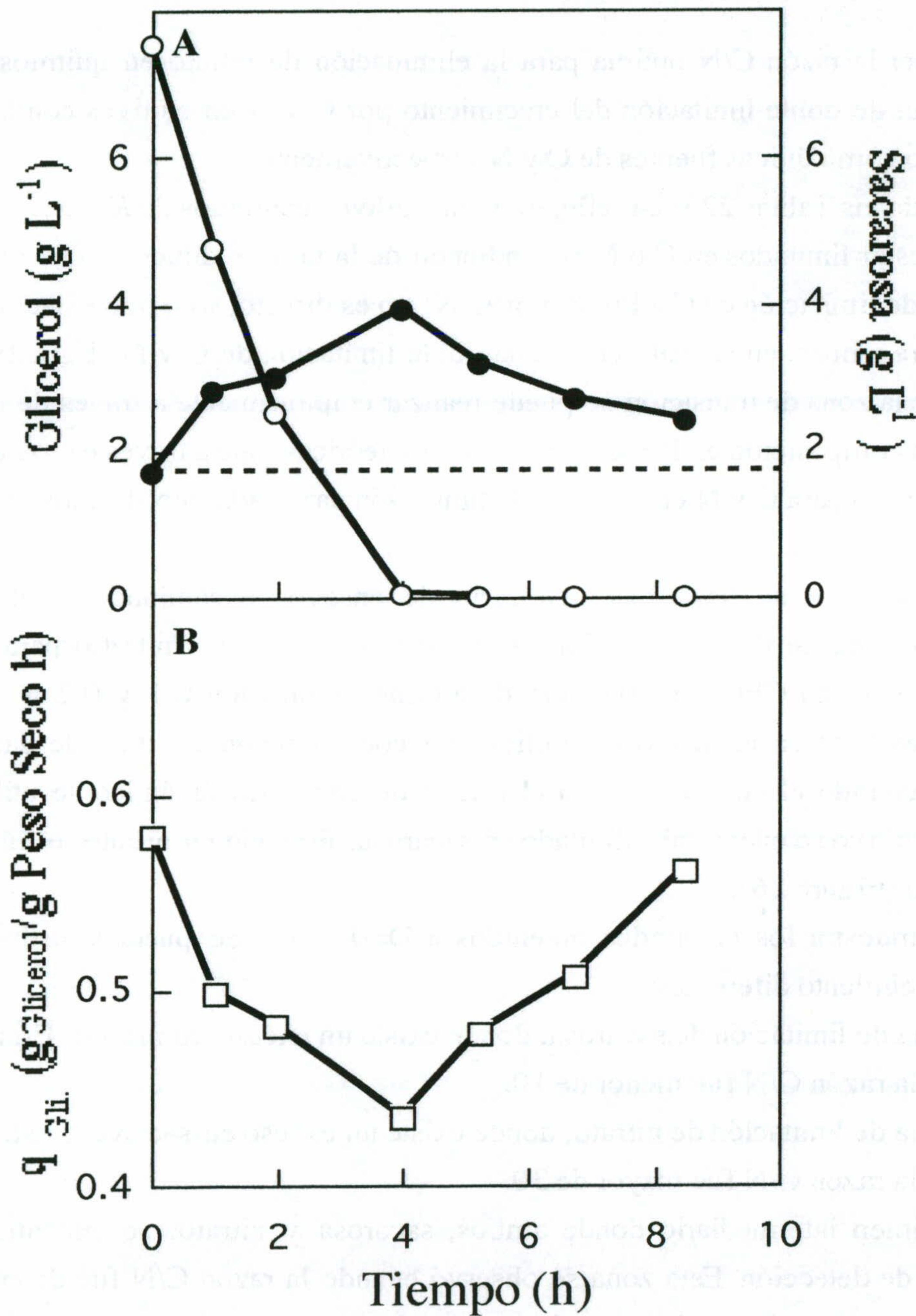
2.4. CONSUMO DE SACAROSA BAJO CONDICIONES DE ESTADO TRANSITORIO EN CULTIVOS CONTINUOS CON GLICEROL

Klebsiella oxytoca CECT 4460 consumía simultáneamente sacarosa y glicerol bajo condiciones de estado de equilibrio dinámico en cultivos continuos, mientras que el consumo fue secuencial en cultivos estancos, con utilización preferencial de sacarosa sobre glicerol. Para estudiar en mayor detalle el comportamiento de esta cepa con respecto a la utilización de estas dos fuentes de carbono, una de las fuentes de carbono (sacarosa) se pulsó en un cultivo continuo bajo condiciones de estado de equilibrio dinámico establecido con glicerol (Fig.25).

Con glicerol como única fuente de carbono y a una tasa de dilución fue $D=0,3 \text{ h}^{-1}$ la biomasa (peso seco) del cultivo de *K. oxytoca* CECT 4460 fue $4,35 \text{ g L}^{-1}$ al alcanzar el cultivo el estado de equilibrio dinámico. Estas células utilizaron glicerol a una tasa de $0,58 \text{ g}$ por g de peso seco por hora; la concentración residual de glicerol en el medio de cultivo fue $1,7 \text{ g L}^{-1}$, y tanto nitrato como nitrito fueron indetectables. Este cultivo se sometió a un pulso de 8 g L^{-1} de sacarosa, y la concentración de sacarosa, glicerol, nitrato y nitrito, así como el crecimiento del cultivo se determinaron a lo largo del tiempo. La concentración de nitrato y nitrito fue inferior a nuestros límites de detección, mientras que el peso seco del cultivo disminuyó de $4,35$ a $4,1 \text{ g L}^{-1}$ durante el tiempo necesario para que se consumiera totalmente la sacarosa. En este ensayo se observó que las células fueron capaces de utilizar simultáneamente sacarosa y glicerol desde el principio del ensayo (Fig. 25A), pero en este caso se observó que la tasa de consumo específico de glicerol disminuyó de $0,58 \text{ g}$ por g de peso seco por hora en ausencia de sacarosa a $0,44 \text{ g}$ por g de peso seco por hora en presencia de sacarosa (Fig. 25B). Esto representa una disminución en el consumo de glicerol de un 25% con respecto al valor en estado de equilibrio dinámico, y como consecuencia el glicerol se acumuló por encima del nivel determinado en el cultivo en el estado de equilibrio dinámico, llegando a alcanzar un valor de $3,9 \text{ g L}^{-1}$ (Fig. 25A). Una vez que la sacarosa fue totalmente consumida, la tasa de consumo de glicerol se incrementó hasta volver al valor determinado en el estado de equilibrio dinámico (Fig. 25B).

El consumo de sacarosa tras el pulso se estimó como la diferencia entre el valor teórico de lavado y la concentración de sacarosa presente en el medio de cultivo. El consumo de sacarosa fue 0.16 g por g de peso seco por hora, requiriéndose 4 horas para el consumo total del pulso de sacarosa. La cantidad de C-sacarosa utilizado por *K. oxytoca* CECT 4460 tras el pulso en el quimiostato fue equivalente a la cantidad de C-glicerol que la bacteria dejó de utilizar. Este resultado sugiere que la utilización simultánea de estas dos fuentes de carbono estuvo sujeta a satisfacer el requerimiento de C de *K. oxytoca* CECT 4460. También se demostró que la utilización de sacarosa en cultivos de *K. oxytoca* CECT 4460 en glicerol fue constitutiva.

Figura 25. Utilización simultánea de sacarosa y glicerol tras un pulso de sacarosa en un quimiostato de *K. oxytoca* CECT 4460 mantenido con glicerol como única fuente de carbono.



Un cultivo continuo de *K. oxytoca* CECT 4460 limitado en nitrato ($D=0,3 \text{ h}^{-1}$) y mantenido en estado de equilibrio dinámico con glicerol como única fuente de carbono, fue sometido a $t=0$ a un pulso de $7,5 \text{ g L}^{-1}$ de sacarosa. A los tiempos indicados se determinaron la concentración de sacarosa (o) y glicerol (o) (Panel A), y la tasa de consumo específico de glicerol (\square) (Panel B). q_{Glicerol} se expresa en g de glicerol consumido por g de peso seco por hora. S_0 (glicerol) = 10 g L^{-1} .

2.5. DETERMINACION DE LA RAZON C/N OPTIMA PARA LA ELIMINACION DE NITRATO EN QUIMIOSTATOS

2.5.1. Determinación de la zona de doble limitación C/N de crecimiento en cultivos continuos de *K. oxytoca* CECT 4460

Para obtener la razón C/N óptima para la eliminación de nitrato en quimiostatos, se determinó la zona de doble limitación del crecimiento por C y N en cultivos continuos con sacarosa y nitrato como únicas fuentes de C y N respectivamente.

Los datos de las Tablas 22 y 24 reflejaron que cultivos continuos de *K. oxytoca* CECT 4460 llegaron a estar limitados en C o N dependiendo de la tasa de dilución (D). El paso de una zona a otra (de limitación en C a limitación en N) no es directo, sino que existe una zona de transición entre ambas, en la cual ocurre una doble limitación de C y N (Egli, 1991). La determinación de la zona de transición se puede realizar empíricamente a través de los datos de cultivo y de la composición en la biomasa, así como teóricamente a través de los datos del rendimiento obtenido para C y N en la zonas de limitación para cada uno de estos substratos (Egli, 1991).

En este apartado, se describen una serie de ensayos encaminados a determinar empíricamente la zona de doble limitación de nutrientes (sacarosa y nitrato) para cultivos continuos de *K. oxytoca* CECT 4460 creciendo a tasas de dilución 0,1 y 0,2 h⁻¹, usando diferentes razones C/N en el medio de cultivo. La concentración residual de sacarosa y nitrato obtenida cuando el cultivo alcanzó el estado de equilibrio dinámico se utilizó para determinar si el cultivo se encontraba limitado en sacarosa, limitado en nitrato, o limitado en sacarosa y nitrato (Figura 26).

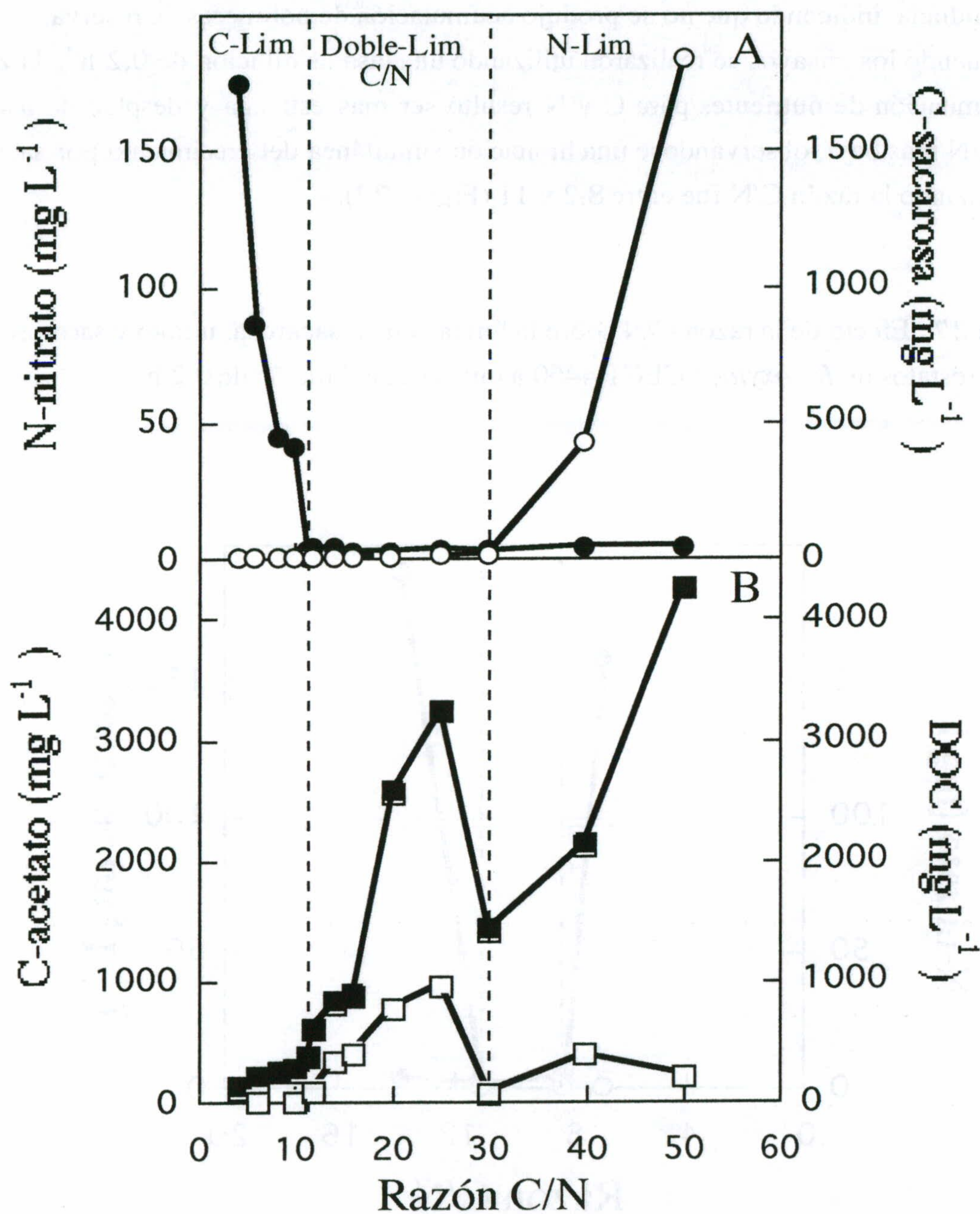
La Figura 26A muestra los resultados obtenidos a D=0,1 h⁻¹. Se pueden distinguir tres regímenes de crecimiento diferentes:

a) Una zona de limitación de sacarosa, donde existe un exceso en nitrato. Esta zona se observó cuando la razón C/N fue menor de 10.

b) Una zona de limitación de nitrato, donde existe un exceso en sacarosa. Esta zona se observó cuando la razón C/N fue mayor de 30.

c) Un régimen intermedio donde ambos, sacarosa y nitrato, se encontraron por debajo del límite de detección. Esta zona se observó cuando la razón C/N fue de entre 10 y 30. Dentro de la zona de transición, se observó un incremento en la medida del carbono orgánico disuelto (DOC) en el medio de cultivo (Fig. 26B). Este incremento en la medida de DOC concuerda con la acumulación en el medio de cultivo de acetato.

Figura 26. Efecto de la razón C/N sobre la limitación en sacarosa, nitrato y sacarosa/nitrato en quimiostatos de *K. oxytoca* CECT 4460 a una tasa de dilución de $0,1 \text{ h}^{-1}$.

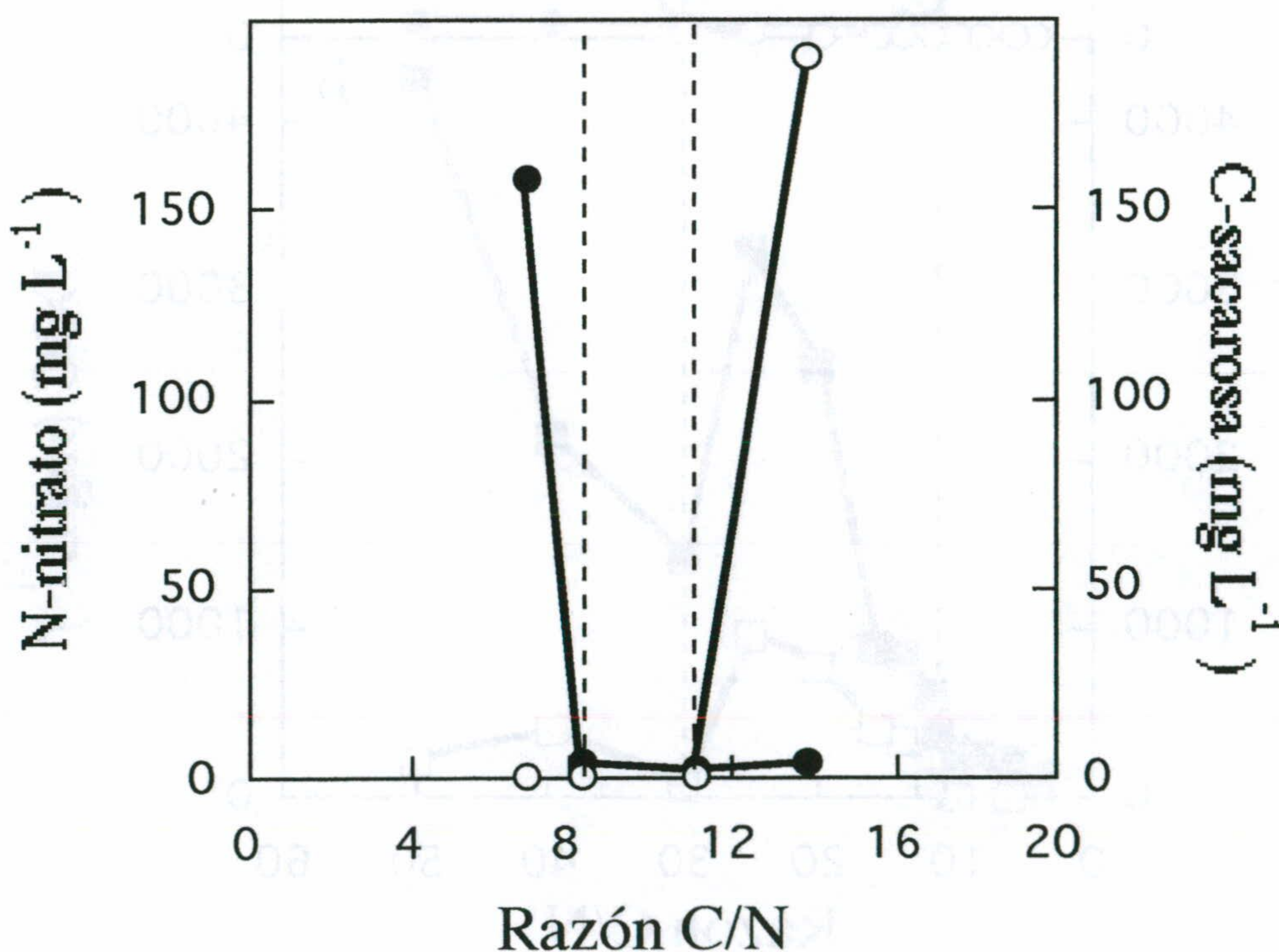


Klebsiella oxytoca CECT 4460 se cultivó en un quimiostato con sacarosa y nitrato a las razones C/N indicadas. Para cada razón C/N se determinó la concentración residual de C-sacarosa (o) y N-nitrato (o) en el estado de equilibrio dinámico (Panel A); y la concentración de acetato (□) y carbono orgánico disuelto (DOC) (■) (Panel B) en el medio de cultivo.

También se estudió si *K. oxytoca* CECT 4460 acumulaba polímeros de reserva en condiciones de limitación de nitrato, sacarosa, o ambos. Para ello se determinó el contenido en C y N de la biomasa obtenida para cada razón C/N estudiada (datos no mostrados). Se observó que la proporción de C y N en la biomasa permaneció constante para cada razón C/N estudiada, indicando que no se produjo acumulación de polímeros de reserva.

Cuando los ensayos se realizaron utilizando una tasa de dilución de $0,2 \text{ h}^{-1}$, la zona de doble limitación de nutrientes para C y N resultó ser más estrecha y desplazada hacia una razón C/N más baja, observándose una limitación simultánea del crecimiento por sacarosa y nitrato cuando la razón C/N fue entre 8,2 y 11 (Figura 27).

Figura 27. Efecto de la razón C/N sobre la limitación en sacarosa, nitrato y sacarosa/nitrato en quimiostatos de *K. oxytoca* CECT 4460 a una tasa de dilución de $0,2 \text{ h}^{-1}$.



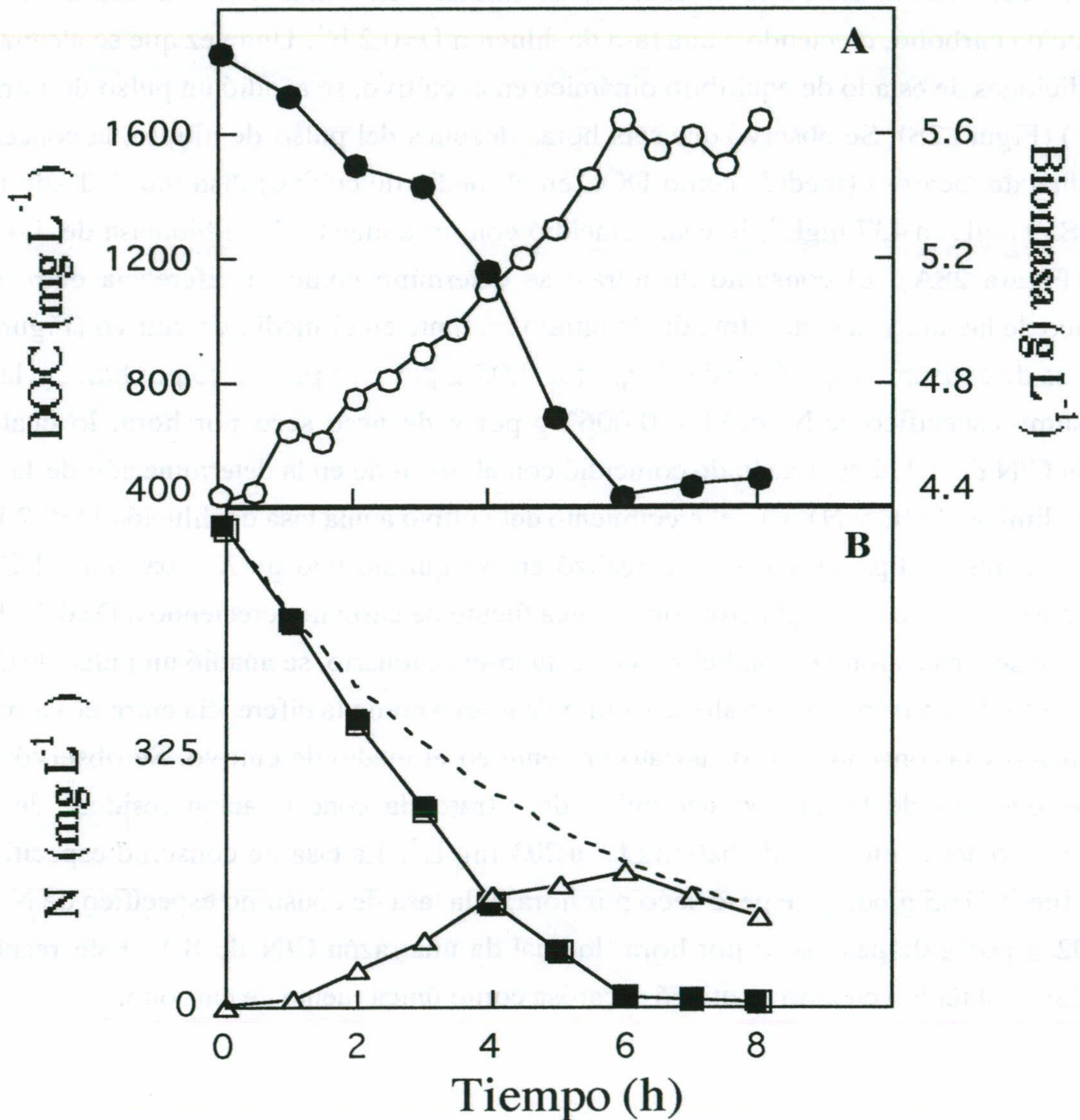
Klebsiella oxytoca CECT 4460 se cultivó en un quimiostato con sacarosa y nitrato a las razones C/N indicadas. Para cada razón C/N se determinó la concentración residual de C-sacarosa (o) y N-nitrato (o) en el medio de cultivo una vez alcanzado el estado de equilibrio dinámico.

2.5.2. Utilización de la técnica del “pulso” para la confirmación de la razón C/N óptima para el sistema de eliminación de nitrato en cultivos continuos de *K. oxytoca* CECT 4460

Con objeto de confirmar los datos obtenidos en el apartado anterior, se estableció un cultivo continuo de *K. oxytoca* CECT 4460 limitado en nitrato y con sacarosa como única fuente de carbono, creciendo a una tasa de dilución $D=0,2 \text{ h}^{-1}$. Una vez que se alcanzaron las condiciones de estado de equilibrio dinámico en el cultivo, se añadió un pulso de nitrato ($2,8 \text{ g L}^{-1}$) (Figura 28). Se observó que seis horas después del pulso de nitrato, la concentración residual de sacarosa (medida como DOC en el medio de cultivo) disminuyó desde un valor de 1859 mgL^{-1} a 437 mgL^{-1} , lo cual coincidió con un aumento de la biomasa de $4,4$ a $5,6 \text{ g L}^{-1}$ (Figura 28A). El consumo de nitrato se determinó como la diferencia entre el valor teórico de lavado y la concentración de nitrato presente en el medio de cultivo (Figura 28B). La tasa de consumo específico de C (q_C) fue $0,05 \text{ g por g de peso seco por hora}$, y la tasa de consumo específico de N (q_N) fue $0,0062 \text{ g por g de peso seco por hora}$, lo cual da una razón C/N de $8,1$. Este resultado coincidió con el obtenido en la determinación de la zona de doble limitación (C y N) para el crecimiento del cultivo a una tasa de dilución $D=0,2 \text{ h}^{-1}$.

El mismo tipo de ensayo se realizó en un quimiostato de *K. oxytoca* CECT 4460 limitado en nitrato y con glicerol como única fuente de carbono, creciendo a $D=0,25 \text{ h}^{-1}$. Una vez que se alcanzaron las condiciones de estado-estacionario, se añadió un pulso de $0,8 \text{ g L}^{-1}$ de nitrato. El consumo de nitrato se estimó de nuevo como la diferencia entre el valor teórico de lavado y la concentración de nitrato presente en el medio de cultivo. Se observó que dos horas después de la adición del pulso de nitrato, la concentración residual de glicerol disminuyó desde un valor de 520 mg L^{-1} a 203 mg L^{-1} . La tasa de consumo específico de C (q_C) fue $0,0165 \text{ g por g de peso seco por hora}$, y la tasa de consumo específico de N (q_N) fue $0,002 \text{ g por g de peso seco por hora}$, lo cual da una razón C/N de $8,1$. Este resultado es similar al obtenido cuando se utilizó sacarosa como única fuente de carbono.

Figura 28. Pulso de nitrato en un quimiostato de *K. oxytoca* CECT 4460 limitado en nitrato y con sacarosa como única fuente de carbono.



Un cultivo continuo de *K. oxytoca* CECT 4460 limitado en nitrato y con sacarosa como única fuente de carbono, se mantuvo en estado de equilibrio dinámico a una tasa de dilución $D=0,2 \text{ h}^{-1}$. A $t=0$ se sometió a un pulso de $2,8 \text{ g L}^{-1}$ de nitrato. A los tiempos indicados se determinaron la biomasa del cultivo (o), concentración de sacarosa (o) (Panel A), y el lavado teórico de nitrato (--), concentración de nitrato en el medio de cultivo (\square) y consumo de nitrato (Δ) (Panel B). La concentración de sacarosa se determinó como DOC en mg L^{-1} . El consumo de nitrato se determinó como la diferencia entre el lavado teórico de nitrato y la concentración real de nitrato en el medio de cultivo (mg L^{-1}).

IV. INCREMENTO DE LA DOSIS GENICA DE NITRITO REDUCTASA EN *KLEBSIELLA OXYTOCA* CECT 4460 PARA FAVORECER LA ELIMINACION DE ALTAS CONCENTRACIONES DE NITRATO

Resumen

Klebsiella oxytoca CECT 4460 elimina altas concentraciones de nitrato sin acumulación de nitrito en el medio de cultivo cuando las condiciones de crecimiento fueron las optimizadas en el capítulo 1. Sin embargo, en determinadas condiciones de cultivo, ej. baja agitación, pH inadecuado, y en particular, con sacarosa como fuente de carbono, *K. oxytoca* CECT 4460 acumuló nitrito en el medio de cultivo. Esto se interpretó como una posible limitación en la reducción de nitrito a amonio como consecuencia de una limitación en el nivel de la actividad nitrito reductasa. Si esta fuese la causa, un aumento en la dosis génica de la nitrito reductasa podría solventar el problema.

En este capítulo se describe el abordaje utilizado para aumentar la dosis génica de nitrito reductasa en *K. oxytoca* CECT 4460 mediante la transferencia a esta cepa del gen *nasB* de *Klebsiella pneumoniae*, el cual codifica la nitrito reductasa (Lin *et al.*, 1993). Se construyeron dos plásmidos de amplio espectro de huésped con el gen *nasB* de *K. pneumoniae*; uno, pUPE2, en el cual el gen *nasB* se expresó a partir del promotor Plac, (el promotor del operón de la lactosa de *Escherichia coli*), y otro plásmido, pUPE3, en el cual el gen *nasB* se expresó constitutivamente desde los promotores Pr (un par de promotores constitutivos en tandem del gen *xyIR* del plásmido TOL de *P. putida*). En *K. oxytoca* CECT 4460 (pUPE2) o (pUPE3), se estudió el efecto del aumento en la dosis génica del gen *nasB* sobre la acumulación de nitrito y amoniaco en el medio de cultivo, observándose que con el incremento en la dosis génica de nitrito reductasa tuvo lugar una disminución de la acumulación de nitrito, y un incremento en la acumulación de amonio en el medio de cultivo, en comparación a la cepa silvestre. El gen *nasB* también se clonó en el minitransposón mini-Tn5 Km (de Lorenzo *et al.*, 1990), y se transfirió al cromosoma de *K. oxytoca* CECT 4460. La cepa *K. oxytoca* CECT 4460-GP1 es un transconjugante que se seleccionó para estudiar el efecto que sobre la acumulación de nitrito en el medio de cultivo ejercía la copia extra del gen *nasB*. Los resultados también mostraron una disminución en la acumulación de nitrito de alrededor del 25% con respecto a la cepa silvestre.

1. ACTIVIDAD NITRATO REDUCTASA Y NITRITO REDUCTASA EN EXTRACTOS CELULARES DE *KLEBSIELLA OXYTOCA* CECT 4460

Quizás, el parámetro que afecta más negativamente al funcionamiento de los sistemas biológicos de eliminación de nitrato sea la acumulación de nitrito durante el tratamiento de los efluentes (Krishnamachari y Clarkson, 1993). Este hecho es particularmente evidente cuando las plantas de tratamiento de aguas residuales reciben altas cargas de nitrato, observándose frecuentemente que el nitrito acumulado inhibe su propio metabolismo sin prevenir la reducción de nitrato a nitrito, lo que da lugar a un ciclo de reducción fútil de nitrato a nitrito.

En cultivos estancos de *Klebsiella oxytoca* CECT 4460 con sacarosa como fuente de carbono, se encontró que en condiciones no óptimas de cultivo tenía lugar la acumulación de nitrito en el medio de cultivo. La cantidad de nitrito acumulado no fue estequiométrica, y representó entre un 20 % y un 50% del nitrato inicial, el resto fue asimilado por la cepa. Estos resultados se interpretaron como que la reducción de nitrato a nitrito fue más rápida que la reducción de nitrito a amoníaco, siendo pues la actividad enzimática nitrito reductasa la limitante del proceso. Una posible vía de solventar la acumulación de nitrito en el medio de cultivo, y a su vez mejorar la eficiencia del sistema de eliminación de nitrato, fue la de incrementar la cantidad de nitrito reductasa en *Klebsiella oxytoca* CECT 4460 aumentando su dosis génica. Esto es particularmente relevante para evitar acumulación de nitrito en plantas industriales, donde el mantenimiento de las condiciones óptimas puede ser complejo, o donde se pueden producir estados transitorios no óptimos debido a diversas limitaciones.

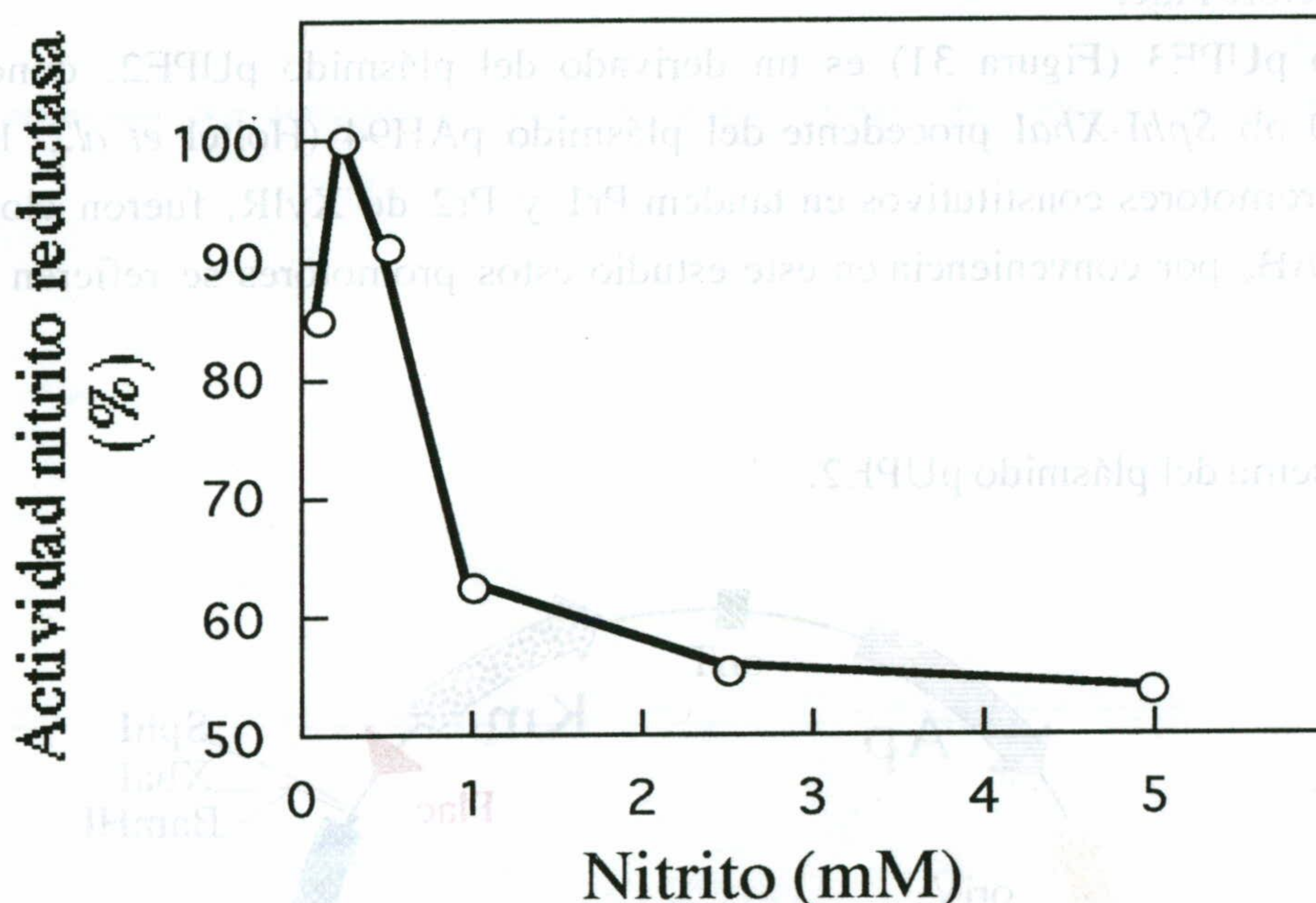
En este apartado se describe la puesta a punto del ensayo para la determinación de la actividad nitrito reductasa de *K. oxytoca* CECT 4460, así como los niveles de las actividades nitrato reductasa y nitrito reductasa en extractos celulares de *K. oxytoca* CECT 4460 cultivada en distintas condiciones. Asimismo, se describen las mejoras llevadas a cabo en la cepa con objeto de incrementar los niveles de actividad nitrito reductasa en base a un incremento de la dosis génica.

1.1. OPTIMIZACION DE LA CONCENTRACION DE NITRITO EN LA MEZCLA DE ENSAYO PARA LA DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD NITRITO REDUCTASA EN EXTRACTOS CELULARES

Para determinar la actividad nitrato reductasa y nitrito reductasa en extractos celulares, células de *K. oxytoca* CECT 4460 fueron cultivadas en medio mínimo con glicerol como única fuente de carbono y nitrato como única fuente de nitrógeno. Una vez alcanzada la fase exponencial de crecimiento, los extractos celulares se prepararon tal y como se describió en la sección de Materiales y Métodos, y fueron utilizados para la optimización de los ensayos *in vitro*. En el caso de la actividad nitrato reductasa no se observó efecto significativo sobre

la misma con concentraciones de nitrato de entre 0,5 y 25 mM. Para el ensayo de la actividad nitrito reductasa la mezcla de ensayo fue la dada en Materiales y Métodos, pero la concentración de nitrito se varió entre 0,1 y 5 mM para optimizar la concentración final en el ensayo. La Figura 29 muestra que la actividad nitrito reductasa en extractos celulares fue máxima cuando la concentración inicial de nitrito fue 0,25 mM. Cuando se aumentó la concentración de nitrito en la mezcla de ensayo, la actividad enzimática disminuyó, siendo ésta del 50% de la actividad máxima al utilizarse 5 mM de nitrito en la mezcla de ensayo.

Figura 29. Efecto de la concentración de nitrito sobre la actividad nitrito reductasa en extractos celulares.



El extracto celular de *K. oxytoca* CECT 4460 contenía 4,4 mg proteína mL⁻¹. El ensayo se realizó a temperatura ambiente. La actividad determinada a 0,25 mM de nitrito fue establecida como el 100% de actividad y correspondió a 0,08 U μ g proteína⁻¹.

1.2. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD NITRATO REDUCTASA Y NITRITO REDUCTASA EN EXTRACTOS CELULARES DE *KLEBSIELLA OXYTOCA* CECT 4460

Una vez que se puso a punto el ensayo para la determinación de la actividad nitrito reductasa, se procedió a la determinación de las actividades nitrato reductasa y nitrito reductasa en extractos celulares de *K. oxytoca* CECT 4460 en células cultivadas en glicerol o sacarosa como fuente de carbono. Cuando las células fueron cultivadas en glicerol, los valores obtenidos para la actividad nitrato reductasa y nitrito reductasa fueron de 0,095 U μ g de proteína⁻¹ y 0,011 U μ g de proteína⁻¹, respectivamente. Cuando las células fueron

cultivadas en sacarosa, los valores obtenidos para la actividad nitrato reductasa y nitrito reductasa fueron de 0,040 U μg de proteína⁻¹ y 0,016 U μg de proteína⁻¹, respectivamente.

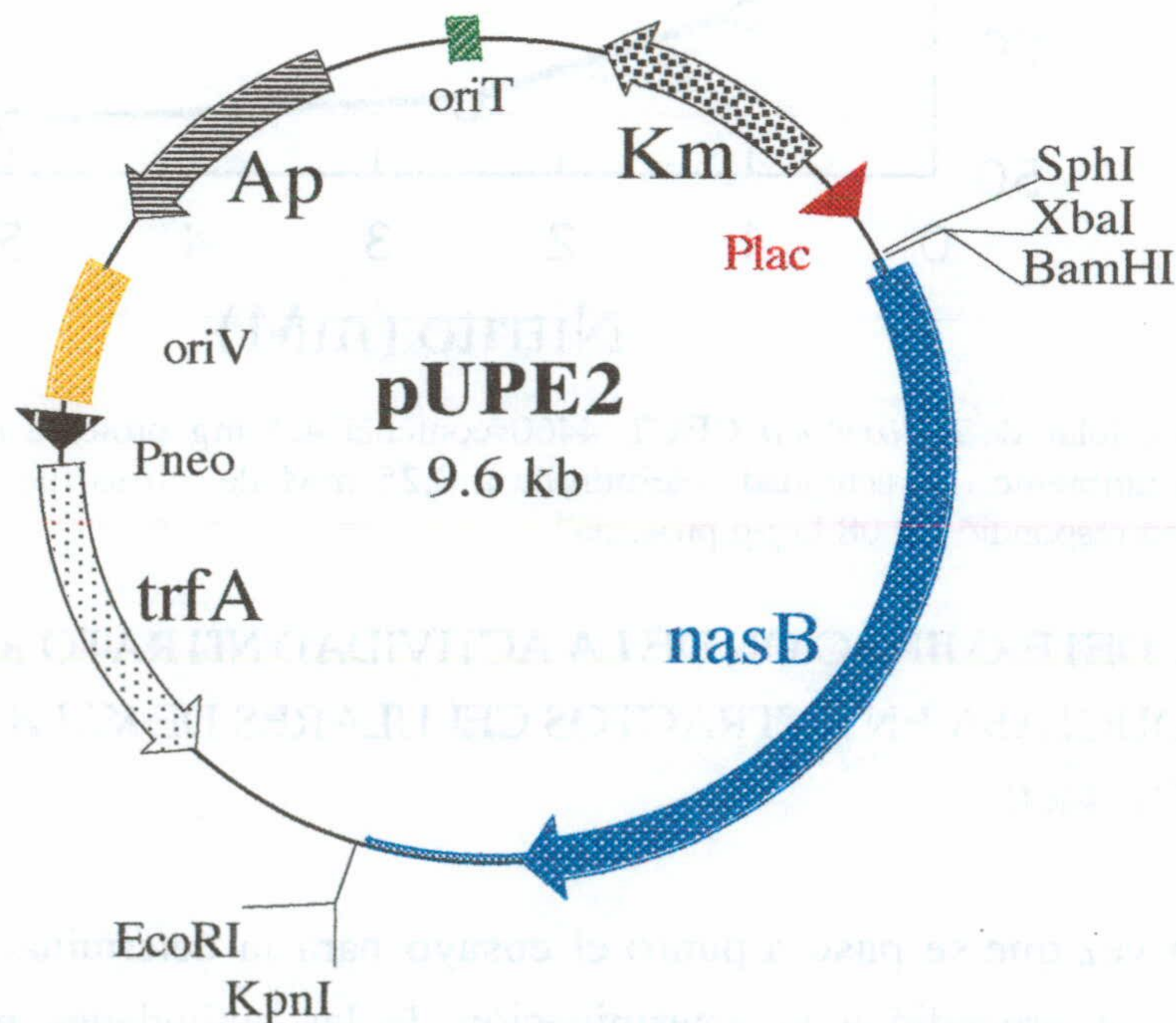
2. TRANSFERENCIA DEL GEN *nasB* DE *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* A *KLEBSIELLA OXYTOCA* CECT 4460

2.1. CONSTRUCCION DE LOS PLASMIDOS pUPE2 y pUPE3

El plásmido pUPE2 (Figura 30) es un derivado del plásmido pJB3KmD que porta el fragmento de 3,6 Kb *Bam*HI-*Kpn*I del plásmido pVJS615 (Lin *et al.*, 1993), el cual contiene el gen *nasB* de *Klebsiella pneumoniae* clonado entre los sitios *Bam*HI-*Kpn*I del vector de clonación. En esta construcción, la expresión de *nasB* se encontró bajo el control del promotor inducible *Plac*.

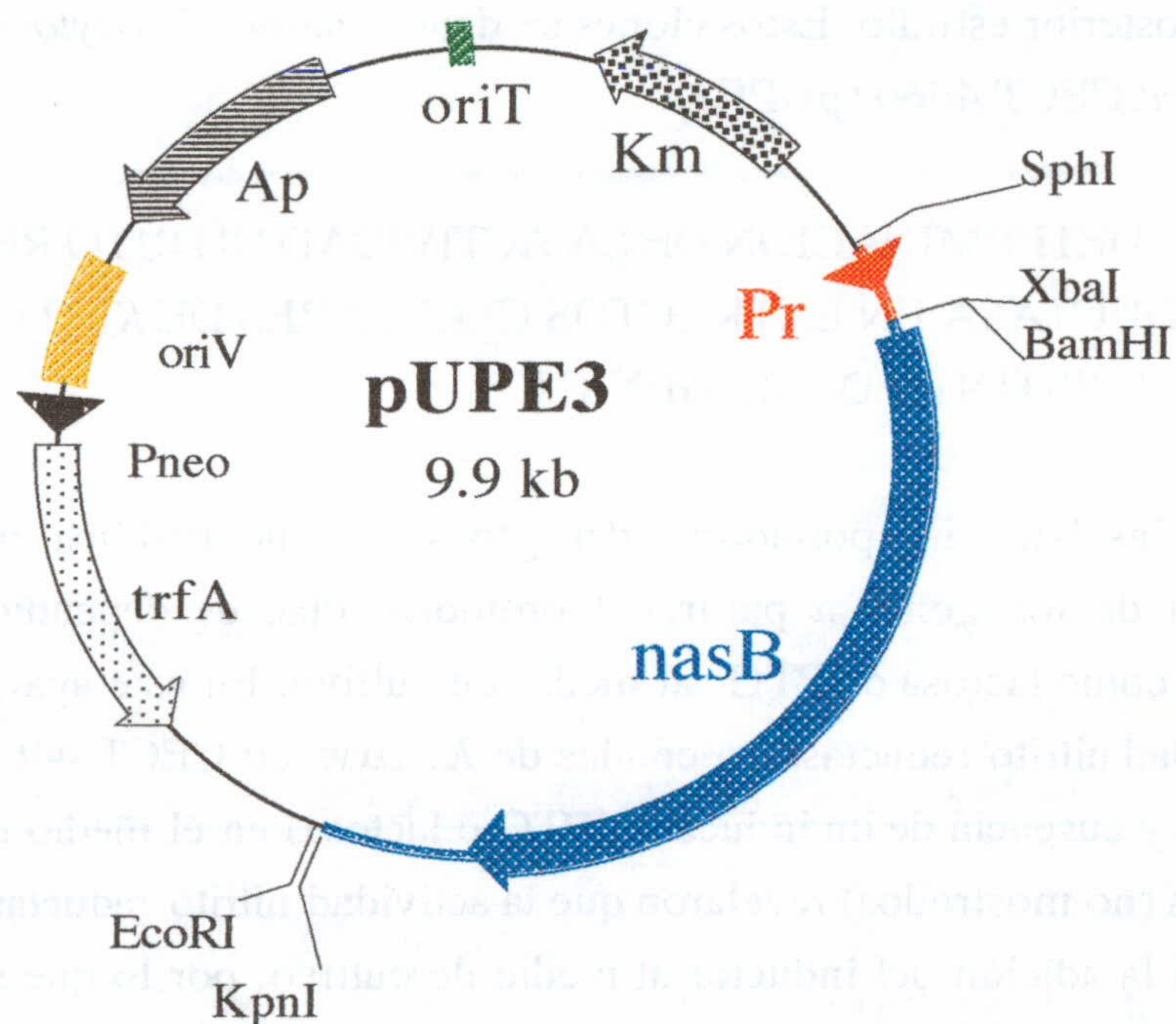
El plásmido pUPE3 (Figura 31) es un derivado del plásmido pUPE2, donde un fragmento de 300 pb *Sph*I-*Xba*I procedente del plásmido pAH94 (Holtel *et al.*, 1990), conteniendo los promotores constitutivos en tandem Pr1 y Pr2 de XylR, fueron clonados delante del gen *nasB*, por conveniencia en este estudio estos promotores se refieren como Pr.

Figura 30. Esquema del plásmido pUPE2.



En el plásmido pUPE2 la expresión del gen *nasB* (azul) se encuentra bajo el control del promotor inducible *Plac* (rojo). En la figura se muestran los sitios de restricción únicos para los enzimas que se indican. Se indica la localización de los orígenes de replicación (*oriV*) y de transferencia (*oriT*) (cajas amarilla y verde respectivamente) y la de los genes de resistencia a ampicilina (*Ap*) y a kanamicina (*Km*). Las distintas flechas indican el sentido de transcripción de los genes.

Figura 31. Esquema del plásmido pUPE3.



En la figura se muestran los sitios de restricción únicos para los enzimas que se indican. El promotor constitutivo Pr se indica en naranja, otros detalles como en la leyenda de la Figura 30.

2.2. INTRODUCCION DE *nasB* EN *KLEBSIELLA OXYTOCA* CECT 4460

Células competentes de *E. coli* JM109 se transformaron con los plásmidos pUPE2 y pUPE3 tal y como se detalla en la Sección de Materiales y Métodos. Posteriormente, los plásmidos pUPE2 y pUPE3 fueron transferidos desde *E. coli* JM109 a *K. oxytoca* CECT 4460 mediante conjugación en presencia de una cepa auxiliar, *E. coli* JM109 portadora del plásmido pRK600, como se describió en Materiales y Métodos. Los transconjugantes de *K. oxytoca* CECT 4460 se seleccionaron en medio mínimo sólido, utilizando nitrato como única fuente de nitrógeno y glicerol como única fuente de carbono, y con $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de kanamicina como antibiótico para la selección del plásmido. La frecuencia de transconjugantes fue de 10^{-4} por receptor, y se eligió un clon de cada conjugación al azar para su posterior estudio. Estos clones se denominaron *K. oxytoca* CECT 4460 (pUPE2) y *K. oxytoca* CECT 4460 (pUPE3).

2.3. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD NITRITO REDUCTASA Y NITRATO REDUCTASA EN EXTRACTOS CELULARES DE *K. OXYTOCA* CECT 4460 CON DISTINTA DOSIS GENICA

En las bacterias portadoras del gen *lacI*, que codifica para el represor LacI, la expresión de los genes a partir del promotor Plac es dependiente de la adición de un inductor, como lactosa o IPTG, al medio de cultivo. En este apartado se determinó el nivel de actividad nitrato reductasa en células de *K. oxytoca* CECT 4460 (pUPE2), cultivadas en presencia y ausencia de un inductor (IPTG o lactosa) en el medio de cultivo. Los resultados obtenidos (no mostrados) revelaron que la actividad nitrato reductasa fue prácticamente igual con o sin la adición del inductor al medio de cultivo, por lo que se suprimió su adición al medio en sucesivos ensayos.

Para determinar si el incremento en la dosis génica de *nasB* en *K. oxytoca* CECT 4460 (pUPE2) o (pUPE3), resultaba en un incremento de la actividad nitrato reductasa en estas cepas, se cultivaron células de *K. oxytoca* CECT 4460, *K. oxytoca* CECT 4460 (pUPE2), y *K. oxytoca* CECT 4460 (pUPE3) en medio mínimo con 40 mM de nitrato y 2% (p/v) de glicerol o sacarosa como fuente de carbono. De células en la fase exponencial de crecimiento se prepararon los extractos celulares, y se determinó la actividad nitrato reductasa y nitrato reductasa. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 28. Se observó que la mayor actividad nitrato reductasa fue obtenida en extractos celulares de *K. oxytoca* CECT 4460 (pUPE2), tanto en extractos celulares procedentes de cultivos con sacarosa, como en aquellos procedentes de cultivos con glicerol. En células cultivadas en glicerol, la actividad nitrato reductasa de *K. oxytoca* CECT 4460 (pUPE2) fue 4 veces mayor que la actividad medida en extractos celulares de la cepa silvestre. La actividad nitrato reductasa en extractos celulares de *K. oxytoca* CECT 4460 (pUPE3) fue 2 veces mayor que la actividad medida en

extractos celulares de la cepa silvestre. Dado que el número de copias de pUPE2 y pUPE3 es similar, el mayor nivel de actividad nitrito reductasa probablemente refleje que el promotor Plac es más fuerte que el promotor Pr en *K. oxytoca* CECT 4460.

También se determinó la actividad nitrato reductasa en los extractos celulares de las tres cepas, y se observó que ésta fue mayor en los extractos celulares de cultivos con glicerol (entre 0,07 y 0,100 U $\mu\text{g prote\u00edna}^{-1}$), que en los extractos celulares de células cultivadas con sacarosa (entre 0,04 y 0,06 U $\mu\text{g prote\u00edna}^{-1}$) (Tabla 28), aunque el valor de la actividad nitrato reductasa fue independiente, como era de esperar, de la presencia de los plásmidos que portaban el gen *nasB*.

Tabla 28. Actividad nitrato reductasa y nitrito reductasa en extractos celulares de *K. oxytoca* CECT 4460 portando o no el gen *nasB* de *K. pneumoniae*.

Cepas	Glicerol		Sacarosa	
	NO ₂ Rasa	NO ₃ Rasa	NO ₂ Rasa	NO ₃ Rasa
<i>K. oxytoca</i>	0,011	0,095	0,016	0,040
<i>K. oxytoca</i> (pUPE2)	0,040	0,100	0,034	0,060
<i>K. oxytoca</i> (pUPE3)	0,024	0,070	0,032	0,050

Las cepas utilizadas para la preparación de los extractos celulares fueron cultivadas en 2% (p/v) de glicerol o sacarosa como fuente de carbono. Las actividades nitrito reductasa y nitrato reductasa se expresan en U $\mu\text{g prote\u00edna}^{-1}$.

2. 4. EFECTO DE LA DOSIS GENICA DE *nasB* EN *KLEBSIELLA OXYTOCA* CECT 4460 SOBRE LA ACUMULACION DE NITRITO Y AMONIO EN EL MEDIO DE CULTIVO

En base a los resultados anteriores se concluyó que la expresión de *nasB* desde el promotor inducible Plac era más fuerte que desde el promotor constitutivo Pr, observándose que la actividad nitrito reductasa fue siempre superior en la cepa portadora del plásmido pUPE2, por lo que se seleccionó *K. oxytoca* CECT 4460 (pUPE2) para posteriores ensayos.

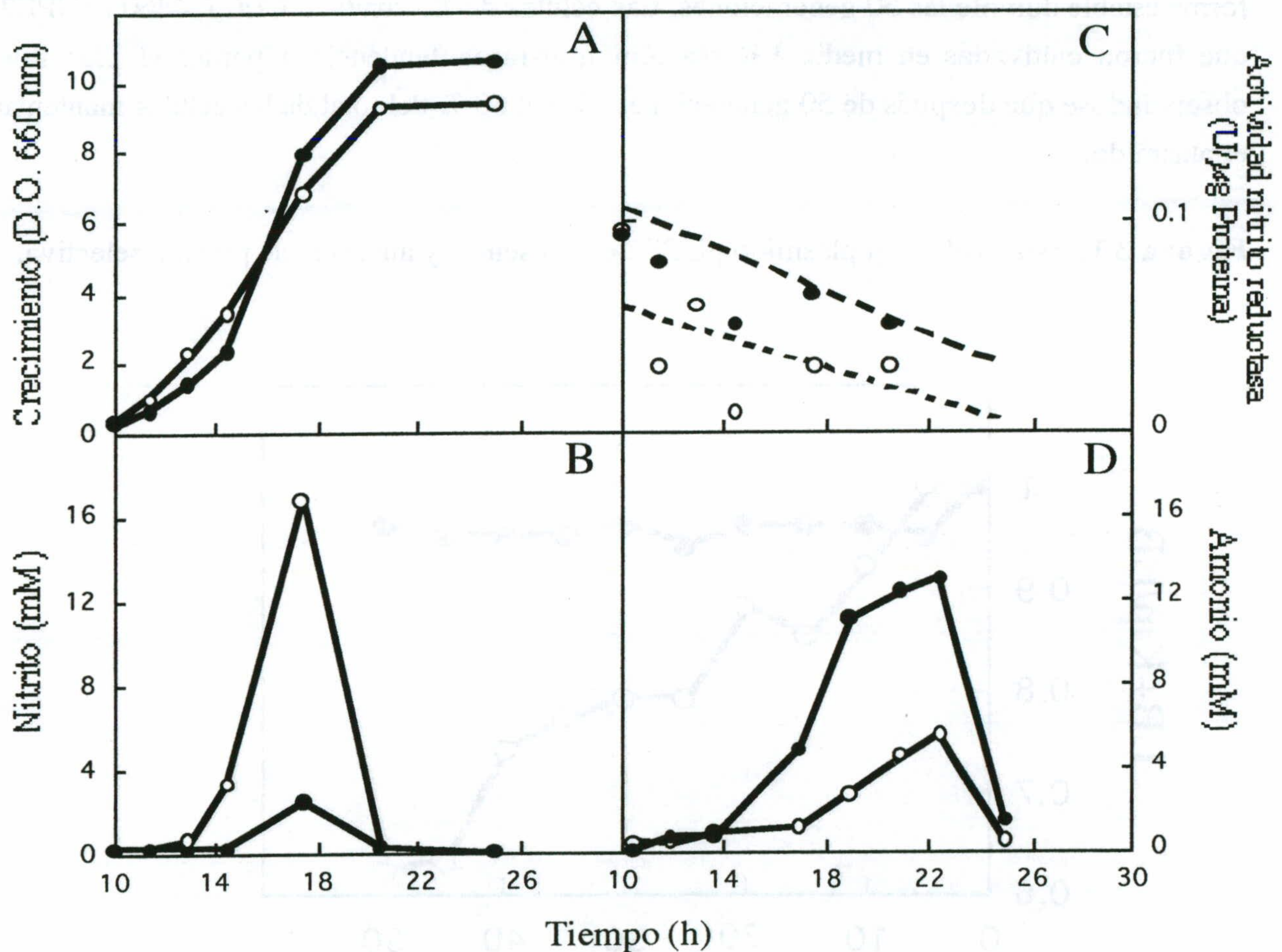
Para determinar el efecto de la dosis génica del gen *nasB* en *K. oxytoca* CECT 4460 sobre la eliminación de nitrato y acumulación de nitrito y amonio en el medio de cultivo, células de *K. oxytoca* CECT 4460, y *K. oxytoca* CECT 4460 (pUPE2), se cultivaron en estanco con medio mínimo conteniendo 40 mM de nitrato y sacarosa (3% p/v) como única

fuelle de carbono. En estos cultivos, se determinó el crecimiento bacteriano, la concentración de nitrato, nitrito y amonio en el medio de cultivo, así como la actividad nitrato reductasa y nitrito reductasa en células permeabilizadas con Triton X-100 (Figura 32). Las dos cepas, *K. oxytoca* CECT 4460 y *K. oxytoca* CECT 4460 (pUPE2), mostraron curvas de crecimiento similares (Fig. 32A) y consumieron nitrato a una tasa similar, siendo éste totalmente eliminado a las 18 horas del inicio del ensayo (datos no mostrados). El nitrito acumulado tras la reducción del nitrato (Fig. 32B), alcanzó un nivel máximo en el medio de cultivo a las 20 horas del inicio del ensayo, con un valor de 17 mM en el sobrenadante de la cepa silvestre y de 2 mM en el sobrenadante de la cepa portadora del plásmido pUPE2 (Fig. 32B). Posteriormente, el nitrito acumulado en el medio de cultivo fue reducido a amonio, el cual se acumuló transitóriamente en el medio de cultivo (Fig. 32D). La acumulación de amonio fue máxima a las 22,5 horas, siendo de 5,5 mM para *K. oxytoca* CECT 4460 (Fig. 32D) y 13 mM para *K. oxytoca* CECT 4460 (pUPE2) (Fig. 32D). Una vez el nitrito fue totalmente consumido, el amonio acumulado en el medio de cultivo fue asimilado por ambas cepas (Fig. 32D).

Tanto en la cepa parental como en la recombinante, el nivel de la actividad nitrito reductasa, determinado en células permeabilizadas, mostró una tendencia a disminuir con el tiempo (Fig. 32C), siendo de entre un 50% a un 30% más bajo al final que al principio del ensayo. En *K. oxytoca* CECT 4460 (pUPE2) el nivel de la actividad nitrito reductasa fue siempre mayor que el nivel de la actividad nitrito reductasa en células permeabilizadas de *K. oxytoca* CECT 4460 sin plásmido (Fig. 32C), en concordancia con los resultados obtenidos en extractos celulares.

También se determinó la actividad nitrato reductasa (datos no mostrados) y se observó que su valor ($1,1 \text{ U } \mu\text{g proteína}^{-1}$) fue relativamente constante en el tiempo.

Figura 32. Efecto de la dosis extra del gen *nasB* en *K. oxytoca* CECT 4460 sobre la acumulación de nitrito y amonio en el medio de cultivo.

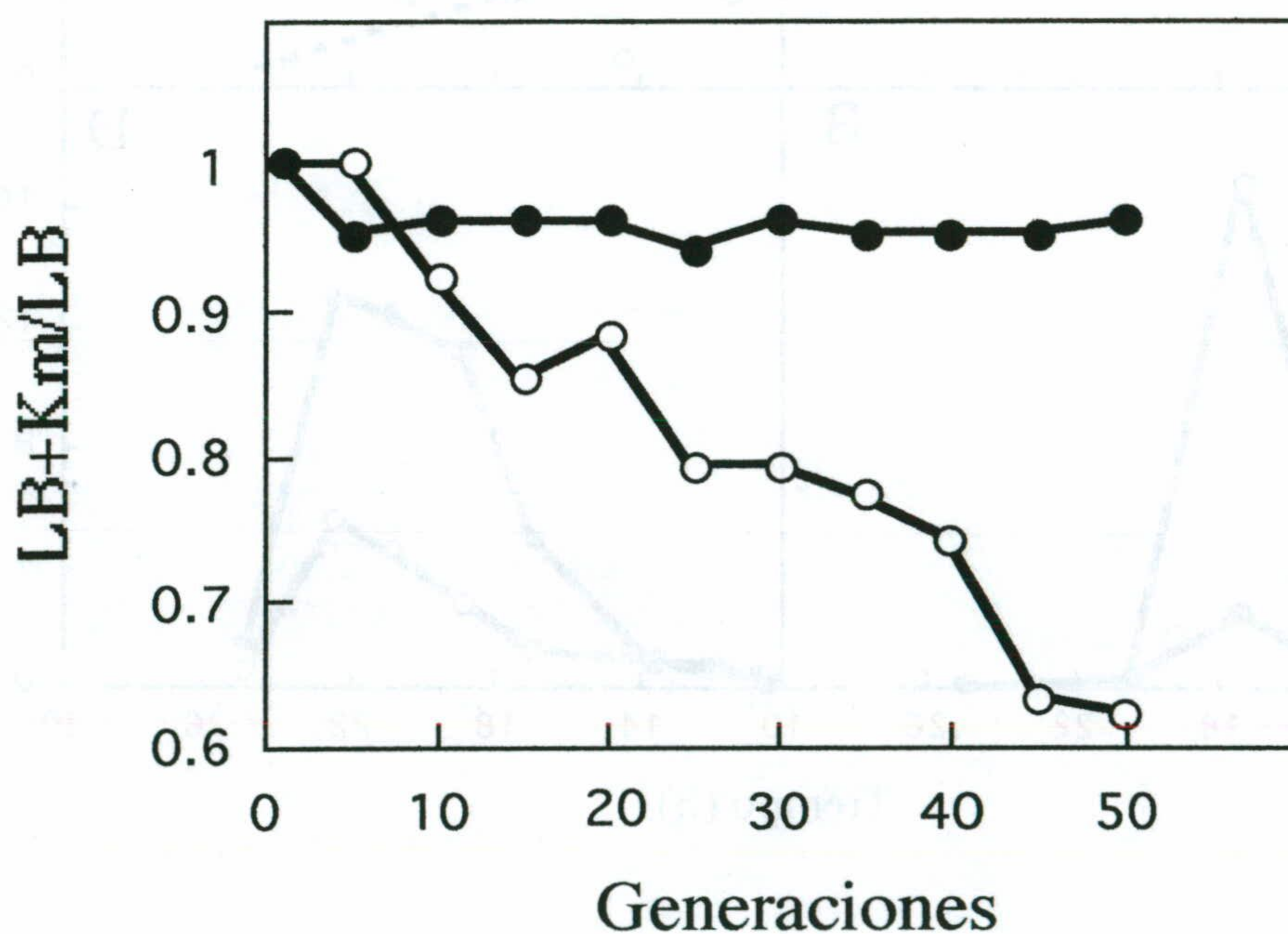


Células de *K. oxytoca* CECT 4460 (o), y *K. oxytoca* CECT 4460 (pUPE2) (o) se cultivaron en medio mínimo con 40 mM de nitrato y 3% (p/v) de sacarosa, y se incubaron a 30°C durante 25 horas. A lo largo del tiempo se determinó el crecimiento bacteriano (Panel A), la concentración de nitrito en el medio de cultivo (Panel B), la concentración de amonio en el medio de cultivo (Panel D), y la actividad nitrito reductasa en células permeabilizadas (Panel C).

2.5. ESTABILIDAD DEL PLASMIDO pUPE2 EN AUSENCIA DE PRESION SELECTIVA

Para determinar si el plásmido pUPE2 era estable en *K. oxytoca* CECT 4460 en ausencia de presión selectiva (adición de Km), células de *K. oxytoca* CECT 4460 (pUPE2) fueron cultivadas en medio líquido LB con y sin Km durante 50 generaciones. Cada 5 generaciones los cultivos fueron diluidos y sembrados en placas de medio sólido LB con y sin Km, y se determinó la razón LB+Km/LB (Fig. 33). Las células de *K. oxytoca* CECT 4460 (pUPE2) que fueron cultivadas en medio LB con Km mantuvieron el plásmido de forma estable durante las 50 generaciones. Las células de *K. oxytoca* CECT 4460 (pUPE2) que fueron cultivadas en medio LB sin Km mostraron tendencia a perder el plásmido, observándose que después de 50 generaciones sólo el 60 % del total de las células mantenían el plásmido.

Figura 33. Estabilidad del plásmido pUPE2 en presencia y ausencia de presión selectiva.



Un cultivo de *K. oxytoca* CECT 4460 (pUPE2) en medio líquido LB con (o) y sin (o) Km, se incubó a 30°C con agitación durante 50 generaciones. Cada 5 generaciones los cultivos se diluyeron y se sembraron en placas con medio sólido LB con y sin Km, y se determinó la razón LB+Km/LB.

3. INTRODUCCION DE UNA COPIA EXTRA DE *nasB* EN EL CROMOSOMA DE *KLEBSIELLA OXYTOCA* CECT 4460

3.1. UTILIZACION DE MINITRANSPOSONES PARA LA INSERCIÓN DE *nasB* EN EL CROMOSOMA DE *K. OXYTOCA* CECT 4460

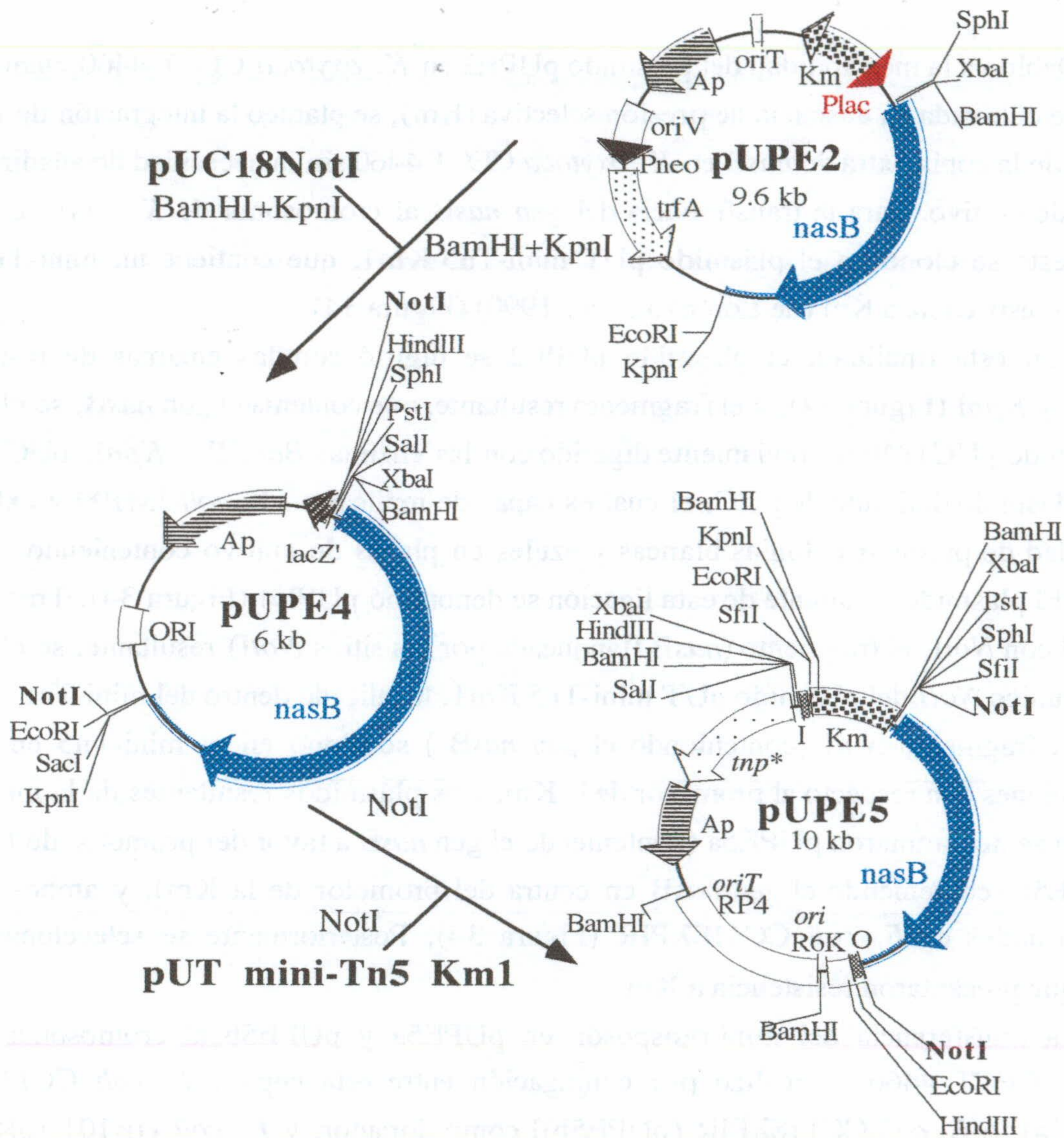
Debido a la inestabilidad del plásmido pUPE2 en *K. oxytoca* CECT 4460 cuando esta cepa fue cultivada en ausencia de presión selectiva (Km), se planteó la integración de manera estable de la copia extra de *nasB* en *K. oxytoca* CECT 4460 sin la necesidad de añadir Km al medio de cultivo. Para la transferencia del gen *nasB* al cromosoma de *K. oxytoca* CECT 4460, éste se clonó en el plásmido pUT mini-Tn5 Km1, que contiene un mini-Tn5 que codifica resistencia a Km (de Lorenzo *et al.*, 1990) (Figura 34).

Con esta finalidad, el plásmido pUPE2 se digirió con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Kpn*I (Figura 34), y el fragmento resultante, que contenía el gen *nasB*, se clonó en el plásmido pUC18*Not*I previamente digerido con las enzimas *Bam*HI y *Kpn*I. pUC18*Not*I es un plásmido derivado de pUC, el cual es capaz de replicar en *E. coli* JM109 y exhibir la propiedad de producir colonias blancas y azules en placas de cultivo conteniendo X-gal e IPTG. El plásmido resultante de esta ligación se denominó pUPE4 (Figura 34). Tras digerir pUPE4 con *Not*I, el fragmento (*nasB* flanqueado por los sitios *Not*I) resultante, se clonó en el sitio único *Not*I del plásmido pUT mini-Tn5 Km1, localizado dentro del mini-Tn5.

El fragmento *Not*I (conteniendo el gen *nasB*) se clonó en el mini-Tn5 en ambas orientaciones con respecto al promotor de la Km. Los plásmidos resultantes de la mezcla de ligación se denominaron pUPE5a (conteniendo el gen *nasB* a favor del promotor de la Km), y pUPE5b (conteniendo el gen *nasB* en contra del promotor de la Km), y ambos fueron transformados en *E. coli* CC118λPIR (Figura 34). Posteriormente se seleccionaron las cepas que presentaron resistencia a Km.

La transferencia del minitransposón en pUPE5a y pUPE5b al cromosoma de *K. oxytoca* CECT 4460 se realizó por conjugación entre esta cepa y *E. coli* CC118λPIR (pUPE5a) [o *E. coli* CC118λPIR (pUPE5b)] como donador, y *E. coli* HB101 (pRK600) como cepa auxiliar. La conjugación se llevó a cabo tal y como se describe en Materiales y Métodos. Los transconjugantes se seleccionaron en placas de medio mínimo M8 conteniendo 20 mM de NO₃K como fuente de nitrógeno, glicerol como fuente de carbono, y Km. Los transconjugantes Km^r aparecieron con una frecuencia de 10⁻⁵ y fueron purificados y seleccionados para posteriores ensayos.

Figura 34. Construcciones utilizadas para la inserción del gen *nasB* en el cromosoma de *K. oxytoca* CECT 4460

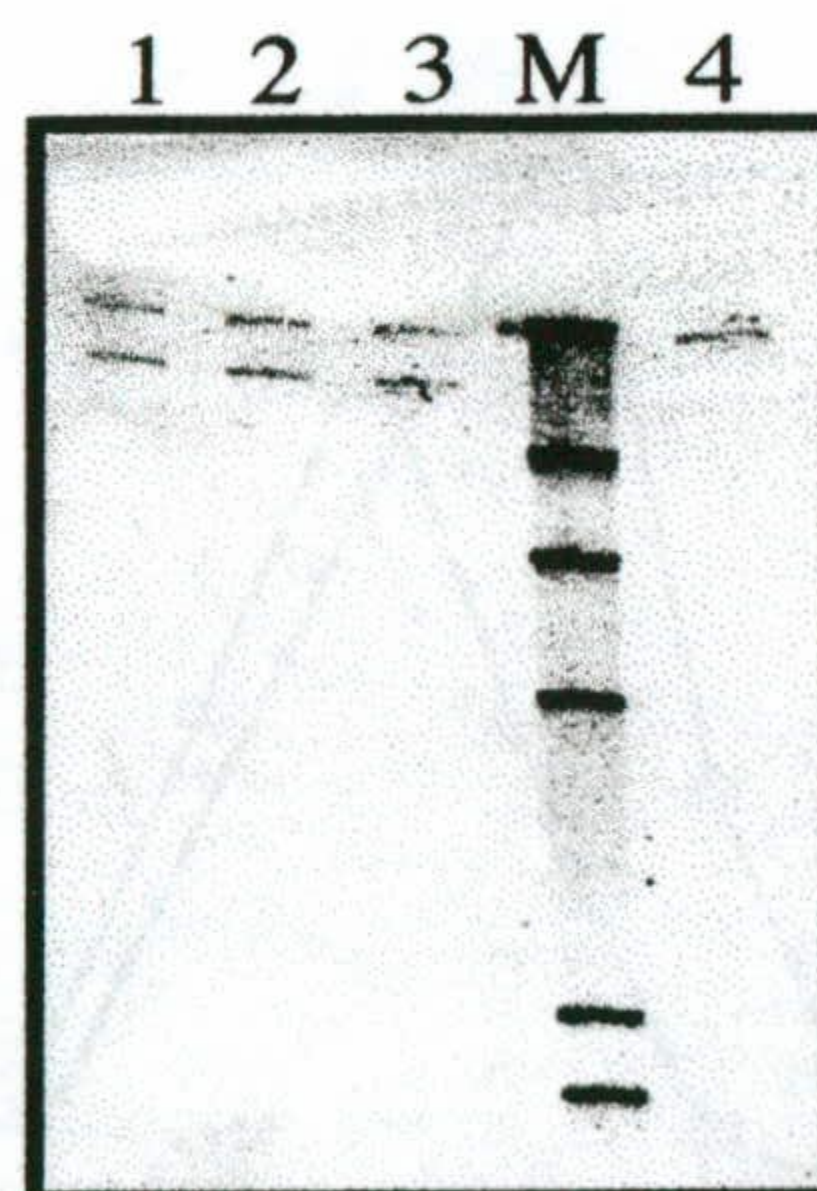


La construcción de los plásmidos pUPE4 y pUPE5 (a y b) se detalla en el texto, y estos fueron utilizados junto con los plásmidos pUC18NotI y pUTmini-Tn5 Km1 para la inserción del gen *nasB* en el cromosoma de *K. oxytoca* CECT 4460. Se indican los genes que confieren resistencia a kanamicina (Km) y ampicilina (Ap), y el gen *nasB* (azul) a lo largo de las construcciones. En la construcción final (pUPE5), los bordes del mini-Tn5 se indican por las letras I (izquierdo) y O (derecho). Se indica además el gen que codifica la transposasa (*tnp**), el origen de replicación (*ori*R6K) y el origen de transferencia (*oriT* RP4)

5.2. ESTABILIDAD DE LA COPIA EXTRA DEL GEN *nasB* EN EL CROMOSOMA DE *K. OXYTOCA* CECT 4460

Para determinar si el gen *nasB* era mantenido de forma estable en el cromosoma de *K. oxytoca* CECT 4460 en presencia y ausencia de presión selectiva (adición de Km), las células de los clones seleccionados en el apartado anterior fueron cultivadas en medio líquido LB con y sin Km durante 50 generaciones. Las cepas seleccionadas fueron la cepa recombinante denominada GP1 (portando el gen *nasB* en orientación contraria al promotor de la Km), y los recombinantes denominados GP2 y GP3 (portando el gen *nasB* en la misma orientación al promotor de la Km), los cuales se seleccionaron por acumular menos nitrito en el medio de cultivo que la cepa silvestre. La cepa silvestre se utilizó como control en este ensayo. A tiempo 0 y 50 generaciones, se preparó ADN total, se digirió con *Hind*III y se hibridó contra el gen *nasB* de *K. pneumoniae*, el cual codifica la nitrito reductasa (Figura 35). En la cepa silvestre, los genes que codifican las enzimas responsables de la asimilación de nitrato fueron localizadas en un fragmento de 17 Kb *Hind*III, como fue el caso para *K. pneumoniae* (Lin *et al.*, 1993; 1994), apareciendo una sola banda de hibridación. La cepa recombinante GP1 mostró 2 copias del gen *nasB* a las 50 generaciones, independientemente de la adición de Km al medio de cultivo, indicando que la copia extra del gen *nasB* se mantenía de forma estable en el cromosoma (Figura 35). Por el contrario, a las 50 generaciones, las cepas recombinantes GP2 y GP3 mostraron dos copias del gen *nasB* solamente cuando la Km era suministrada al medio de cultivo, sugiriendo que el gen *nasB* se encontraba aún en el plásmido utilizado como herramienta para la inserción del transposón en el cromosoma (datos no mostrados). Por esta razón se descartaron estos clones.

Figura 35. Hibridación de ADN total cromosómico de la cepas GP1 y *K. oxytoca* CECT 4460 con la sonda de *nasB*.



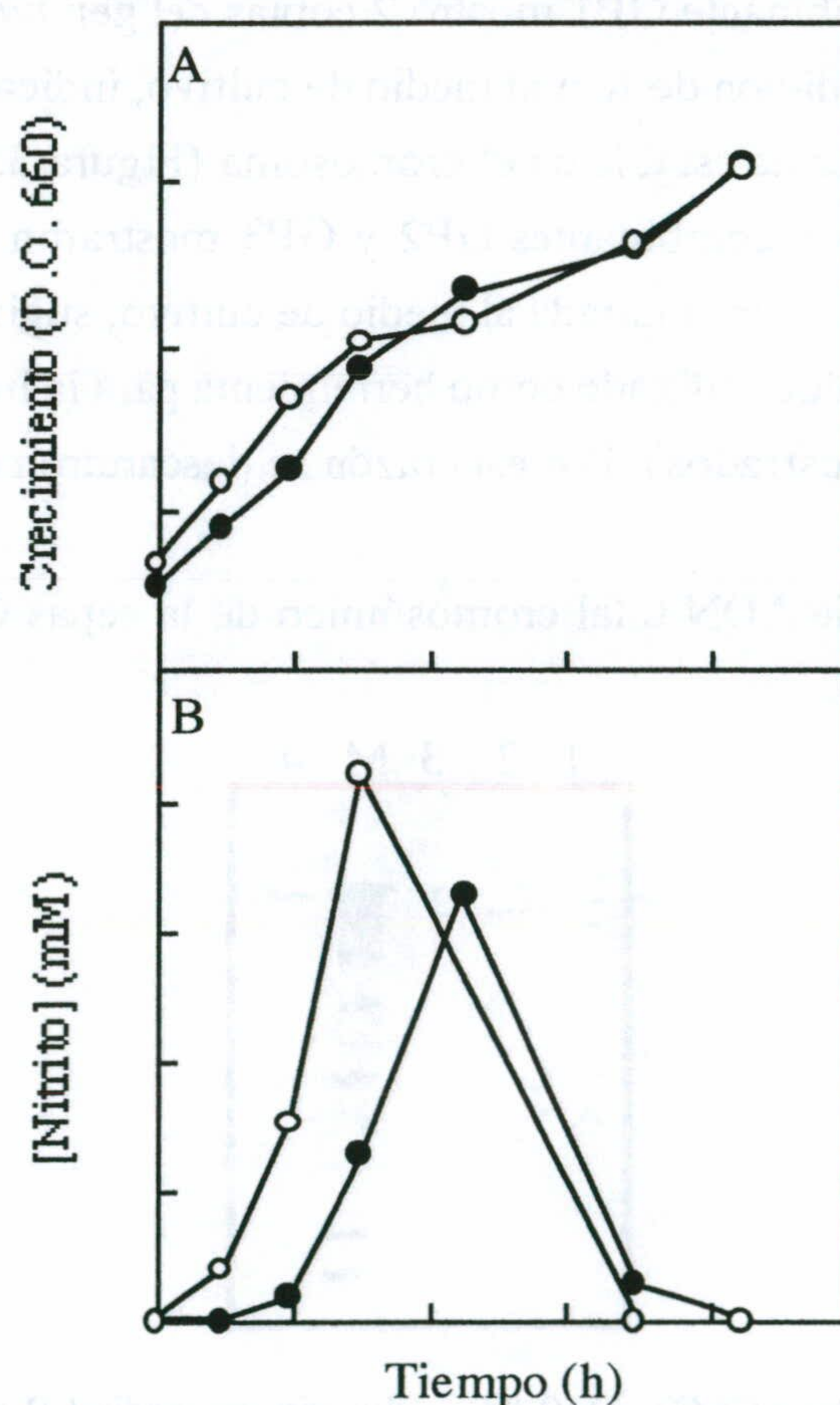
ADN total de células de *K. oxytoca* CECT 4460-GP1 cultivadas en medio LB con (calle 2) y sin (calle 3) Km durante 50 generaciones, se hibridó contra el gen *nasB* de *K. pneumoniae*, tal y como se detalla en la Sección de Materiales y Métodos. Como controles se utilizó el ADN total de *K. oxytoca* CECT 4460-GP1 preparado a t=0 (calle 1) y el ADN total de *K. oxytoca* CECT 4460 preparado a t=0 (calle 4). Se utilizó el marcador II de Boheringer-Mannheim marcado con digoxigenina (calle M).

3.3. EFECTO DE LA COPIA EXTRA DE *nasB* EN EL CROMOSOMA DE *K. OXYTOCA* CECT 4460 SOBRE LA ACUMULACION DE NITRITO EN EL MEDIO DE CULTIVO

Para determinar el efecto de la copia extra del gen *nasB* en el cromosoma de *K. oxytoca* CECT 4460 sobre la acumulación de nitrito en el medio de cultivo, células de la cepa GP1 se cultivaron en medio mínimo con 40 mM de nitrato y sacarosa (3% p/v) como fuente de carbono. La cepa silvestre se utilizó como control en este ensayo.

En cultivos estancos se determinó el crecimiento bacteriano de la cepa GP1, y el de la cepa silvestre, y la acumulación de nitrito en el medio de cultivo por las mismas (Figura 36). Las cepas mostraron curvas de crecimiento similares (Figura 36A). El clon recombinante GP1, mostró una reducción en la acumulación de nitrito de alrededor del 25% con respecto a la cepa silvestre; no obstante, no se alcanzó una reducción del nitrito en el medio de cultivo tan eficiente como la alcanzada con la cepa portadora del plásmido pUPE2 (ver Figura 32).

Figura 36. Efecto de la dosis extra del gen *nasB* en el cromosoma de *K. oxytoca* CECT 4460 sobre el crecimiento y la acumulación de nitrito en el medio de cultivo.



Células de *K. oxytoca* CECT 4460 (o), y de la cepa GP1 (●), se cultivaron en medio mínimo con 40 mM de nitrato y 3% (p/v) de sacarosa, y se incubaron a 30°C durante 21 horas. A lo largo del tiempo se determinó el crecimiento bacteriano (Panel A), y la concentración de nitrito en el medio de cultivo (Panel B).

DISCUSSION



10/10/10

10/10/10

La alteración del ciclo natural del nitrógeno por el uso abusivo de compuestos nitrogenados como fertilizantes, así como por las distintas actividades industriales, está alterando la ecología de una forma muy negativa. A pesar de la amplia distribución de organismos capaces de utilizar nitrato y la gran variedad de ambientes donde este compuesto sirve para múltiples propósitos, esta forma inorgánica de nitrógeno es un contaminante, y su eliminación es una prioridad para un gran número de agencias de protección medioambiental (Council of the European Community, 1991; Puckett, 1995; Sayre, 1988; Tanaka y Emori, 1993).

Las aguas residuales industriales ricas en compuestos nitrogenados, y en particular nitrato, tienen una composición diversa dependiendo de la industria que las genera, por lo que su tratamiento en plantas convencionales para el tratamiento de aguas urbanas, modificadas para la eliminación biológica de estos compuestos, presenta dificultades y los resultados obtenidos no son siempre satisfactorios. Los procesos de nitrificación-desnitrificación, mencionados en la Sección de Introducción, han mostrado ser útiles para el tratamiento de aguas con bajo contenido en nitrógeno ($<50 \text{ mg L}^{-1}$). Por el contrario, el potencial de estos procesos ha sido escasamente probado en aquellos casos en que la cantidad de nitrógeno, especialmente NO_3^- , es $> 1000 \text{ mg L}^{-1}$, y en ausencia de cantidades significativas de materia orgánica biodegradable. Existen distintos tipos de industrias, como las mencionadas en la Tabla 2 de la Sección de Introducción, que producen aguas residuales cuyo contenido en nitrato tiene valores de entre 5000 y 50000 $\text{mg NO}_3^- \text{ L}^{-1}$. Estas aguas requieren un tratamiento previo, en la propia industria que las genera, para la eliminación del nitrato hasta niveles aceptables antes de su vertido a las plantas de tratamiento convencionales.

En el trabajo que se presenta en esta Tesis Doctoral se ha examinado el potencial para la bioremediación de aguas residuales ricas en nitrato por dos cepas aisladas de los suelos de una fábrica de producción de explosivos, pertenecientes a los géneros *Klebsiella* y *Arthrobacter*, tolerantes a altas concentraciones de nitrato, determinando, en la propia fábrica, como estos microorganismos se comportan en efluentes residuales conteniendo más de 30000 mg L^{-1} de nitrato procedente de la producción de dinitroetilenglicol. También se han hechos esfuerzos para hacer viable, desde el punto de vista económico, la instalación de este proceso a nivel industrial. Para ello se ha estudiado la influencia de fuentes de carbono de bajo coste económico sobre la eficacia del sistema, y se ha determinado la razón C/N óptima necesaria para la eliminación de nitrato sin acumulación de metabolitos no deseados en el efluente. Finalmente, se ha mejorado genéticamente la cepa perteneciente al género *Klebsiella*, aislada en este estudio, mediante la introducción de una dosis extra de nitrato reductasa en el cromosoma para, de esta forma, disminuir el riesgo de acumulación de nitrato en el efluente tratado.

1. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE BACTERIAS TOLERANTES A ALTAS CONCENTRACIONES DE NITRATO

En los tratamientos biológicos de aguas residuales urbanas se utilizan complejas comunidades microbianas no definidas, las cuales son capaces de hacer frente a concentraciones relativamente bajas de nitrato, similares a las concentraciones encontradas en los ambientes naturales. No obstante, cuando estas plantas de tratamiento de aguas reciben altas concentraciones de nitrato, procedente de descargas industriales, el crecimiento celular de estas comunidades se inhibe debido a la reducción futil de nitrato a nitrito por microbios existentes en la propia comunidad (Krisnamachari y Clarkson, 1973; Wilderer *et al.*, 1987), o bien por una limitación en la actividad nitrito reductasa (Wilderer *et al.*, 1987). Se especula que la limitación en la actividad nitrito reductasa puede deberse a la síntesis de este enzima a una tasa más baja que la nitrato reductasa (Betlach y tiedje, 1981, Krisnamachari y Clarkson, 1993), a la existencia de una fase lag necesaria para la adaptación enzimática a nitrito (Blaszczyk 1992; Krisnamachari y Clarkson, 1993), o bien al efecto inhibitorio del nitrato sobre la inducción de este enzima, tal y como observó Blaszczyk (1992) en cultivos puros de *Pseudomonas* spp. La acumulación de nitrito en los efluentes tratados produce una pérdida de la viabilidad celular (Rake y Eagon, 1980; Yarbrough *et al.*, 1980; Almeida *et al.*, 1995a), y es uno de los mayores problemas a los que tienen que hacer frente las plantas de tratamiento de aguas que reciben altas cargas de nitrato.

El tratamiento de aguas con un contenido en nitrato mayor de 1000 mg L⁻¹ (entre 5000 y 50000 mg L⁻¹), ha sido descrito por Pitt *et al.* (1981); Walker *et al.* (1989); Francis y Makin (1977); y Clark *et al.* (1975). En todos los casos descritos se utiliza la desnitrificación como vía de eliminación de nitrato, utilizando las comunidades microbianas antes mencionadas o bien, más raramente, algún cultivo puro de *Pseudomonas* spp. o *Paracoccus denitrificans* (Clark *et al.*, 1975; Baumann, 1996, 1997). Las tasas de desnitrificación alcanzadas, descritas en estos trabajos, dependieron de la concentración de nitrato en el influente a tratar. Es de destacar que en la mayoría de los casos en que la concentración de nitrato fue ≥ 1000 mg L⁻¹, se encontró acumulación de nitrito en los efluentes tratados (Clarkson *et al.*, 1991; Clifford y Liu, 1993; Francis *et al.*, 1977; Krishnamachari y Clarkson, 1993), así como de óxidos de nitrógeno (Baumann, 1996; 1997), que son productos no deseados debido a su toxicidad, por lo que esta concentración de nitrato se considera restrictiva para la mayoría de los microorganismos desnitrificantes y no debe excederse en las plantas de tratamiento biológico.

En este sentido, se estimó que las plantas biológicas operadas con microorganismos caracterizados (individuales o comunidades) son, en principio, más predecibles desde el punto de vista funcional, ya que hacen posible la optimización de las condiciones de cultivo y de los parámetros necesarios para una mayor eficacia en la eliminación de nitrato, así como el seguimiento de los metabolitos producidos.

Para el aislamiento de microorganismos tolerantes a nitrato, en este estudio se razonó que, aquellos ambientes que han sido expuestos a altas concentraciones de nitrato podrían ser colonizados por microbios capaces de tolerar concentraciones relativamente altas de este compuesto. Para comprobar si esta hipótesis era cierta, en los suelos de la fábrica de explosivos de Paramo de Masa (Burgos) perteneciente a UEE, cerca de la zona de vertido de aguas contaminadas con nitrato, se buscaron microorganismos capaces de crecer a expensas del nitrato existente en las aguas residuales procedentes de la fabricación de dinitroetilenglicol, utilizando una concentración de 40 mM (2480 mg L⁻¹) de NO₃⁻, la cual es restrictiva para el crecimiento de muchos microorganismos (Francis *et al.*, 1991; Pitt *et al.*, 1981). Como resultado, se aislaron dos cepas, una perteneciente al género *Klebsiella*, identificada como *K. oxytoca* y otra perteneciente al género *Arthrobacter*, identificada como *A. globiformis*, las cuales se depositaron en la Colección Española de Cultivos Tipo bajo los números de acceso CECT 4466 y CECT 4500 respectivamente.

Es de destacar que *K. oxytoca* CECT 4466 y *A. globiformis* CECT 4500 son tolerantes a concentraciones de hasta 1M de nitrato, lo cual marca una diferencia significativa con otras bacterias capaces de usar este compuesto. La sensibilidad a nitrato ha sido observada en cepas de *Anacystis*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Rhodopseudomonas*, *Azotobacter*, (Pitt *et al.*, 1981; Ramos *et al.*, 1982; 1996), y ahora, en este estudio se ha determinado la sensibilidad a nitrato por *P. putida* 2440, *E. coli* ET8000, cepas pertenecientes al género *Klebsiella*, *Arthrobacter* y *Bacillus*. Estos organismos, normalmente, no son capaces de tolerar concentraciones de entre 50-100 mM, lo cual es de 10 a 20 veces inferior al nivel de nitrato tolerado por las cepas aisladas en este trabajo.

Otro hecho significativo es que ambas cepas son capaces de usar este compuesto como única fuente de nitrógeno a concentraciones de hasta 175 mM (10850 mg L⁻¹) en el medio de cultivo. Esta concentración es 10 veces superior a la descrita como restrictiva en un gran número de plantas de tratamiento biológico, tal y como se ha mencionado anteriormente.

El mecanismo(s) por el cual *K. oxytoca* CECT 4460 y *A. globiformis* CECT 4500 fueron capaces de tolerar altas concentraciones de nitrato es(son) desconocido(s). Una forma para reducir la concentración de nitrato en la célula es el transporte activo de nitrato fuera de la célula por un sistema de exclusión. Este tipo de sistemas de transporte activo han sido previamente descritos para explicar la tolerancia a antibióticos hidrofóbicos en bacterias (Levy, 1992) y más recientemente para disolventes orgánicos (Isken y de Bont, 1996; Ramos *et al.*, 1997). Otro mecanismo, que parece estar implicado en la tolerancia de estas cepas a altas concentraciones de nitrato, es la morfología que adoptan las células en presencia de nitrato. En ambas cepas se han observado diferencias significativas en cuanto a la morfología de su pared celular dependiendo de la presencia o ausencia de nitrato en el medio de cultivo. En el caso de *K. oxytoca* CECT 4460 se observó un engrosamiento de la pared celular, así como la formación de prolongaciones en la envoltura externa a modo de

filamentos cuando esta cepa fue cultivada en presencia de nitrato. En el caso de *A. globiformis* CECT 4500 se observaron cambios morfológicos consistentes en la formación de agregados celulares, generalmente formados por 4-6 células, cuando esta cepa fue cultivada en presencia de nitrato. Esta podría ser una forma de reducir la superficie expuesta a nitrato, aunque la implicación de este cambio morfológico en la tolerancia a nitrato no ha sido aún elucidado. Dado que el nivel enzimático de nitrato reductasa fue independiente de la concentración de nitrato en el medio de cultivo, la tasa de asimilación de nitrato no parece estar involucrada en la tolerancia a este compuesto, no obstante, si se observan unos altos niveles enzimáticos.

En este trabajo, se pretende resaltar que los procesos biotecnológicos para la eliminación de altas cargas de nitrato son posibles siempre y cuando los microorganismos capaces de tolerar altas concentraciones de nitrato estén disponibles, y estos microorganismos sean capaces de eliminar nitrato sin acumulación de otros metabolitos tóxicos.

2. OPTIMIZACION DEL SISTEMA DE ELIMINACION DE NITRATO

2.1. A ESCALA DE LABORATORIO EN FERMETADORES DE 2 L

Los datos obtenidos en el Capítulo I de Resultados muestran que la eliminación de nitrato, mediante la ruta asimilatoria, por *K. oxytoca* CECT 4460 y *A. globiformis* CECT 4500, bajo las condiciones óptimas de operación, ocurre sin acumulación de nitrito en el medio de cultivo. Esto representa una ventaja significativa sobre los organismos capaces de reducir nitrato a concentraciones similares (100 mM), e incluso inferiores, mediante la ruta respiratoria (desnitrificación), ya que estos cultivos siempre acumulan nitrito (Krisnamachari y Clarkson, 1993; Almeida *et al.*, 1995b).

Para establecer las condiciones óptimas de operación para el tratamiento biológico de aguas residuales con altas cargas de nitrato, utilizando cepas pertenecientes a los géneros *Klebsiella* y *Arthrobacter*, se utilizaron reactores de 2 L con agitación. Cada uno de los parámetros necesarios para el funcionamiento del sistema fue estudiado en condiciones aeróbicas para ambas cepas. El aire fue suministrado a una tasa de 1 L de aire por L de cultivo por minuto; la agitación (sistema rotacional) fue variado entre 200 y 1000 rpm; la temperatura fue variada entre 15°C y 40°C; el pH fue variado entre 5 y 9. En estos ensayos se usó medio mínimo con 20-100 mM de nitrato procedente de guas residuales procedentes de la fabricación de explosivos, y 10-50 g de glicerol o etilenglicol por L. Las condiciones óptimas, entendiendo éstas como las necesarias para obtener la fase lag de crecimiento más corta, el crecimiento más rápido, y el mayor consumo de nitrato, fueron las siguientes: agitación ≥ 400 rpm, temperatura $27,5 \pm 2,5$, y pH $7 \pm 0,5$. El rendimiento para C y N fue

máximo para *K. oxytoca* CECT 4460 y *A. globiformis* CECT 4500 cuando estas condiciones fueron mantenidas a estos niveles.

En el caso de *K. oxytoca* CECT 4460 estos parámetros también se estudiaron en condiciones anóxicas y se observó que el rendimiento de los cultivos anaerobios fue menor que el de los aerobios, como era de esperar. La Tabla 29 compara las condiciones óptimas de operación para *K. oxytoca* CECT 4460 en condiciones aeróbicas y anaeróbicas.

Tabla 29. Resumen de las condiciones óptimas de operación para *K. oxytoca* CECT 4460 en condiciones aeróbicas y anaeróbicas

Parámetro	condiciones aeróbicas	condiciones anaeróbicas
Agitación (rpm)	≥ 400	≥ 400
Temperatura (°C)	20-35	25-35
pH	5,5-8	7-7,5

Como se observa, el efecto de la agitación sobre la eficiencia en el sistema de eliminación de nitrato por esta cepa fue similar en condiciones aeróbicas y anóxicas. Sin embargo, se observaron diferencias significativas en cuanto al efecto de la temperatura, ya que en anaerobiosis cinco grados por encima o por debajo de la temperatura óptima (40°C o 20°C respectivamente) se observó una notable acumulación de nitrito en el medio de cultivo (ver Tabla 11). Esto sugiere que la reducción de nitrito a óxido de nitrógeno es el paso limitante más importante en el proceso de eliminación de nitrato en condiciones anaeróbicas por *K. oxytoca* CECT 4460. En condiciones de aerobiosos 5°C por encima o por debajo del intervalo óptimo no fue tan crítico como en condiciones de anaerobiosis, puesto que los cultivos alcanzaron un buen rendimiento celular y no acumularon nitrito. Finalmente, el pH fue el parámetro que actuó de forma más crítica en condiciones de anaerobiosis, siendo el intervalo óptimo de pH en estas condiciones entre 7-7,5. Este intervalo fue mucho más amplio en condiciones de aerobiosis (entre 5,5 y 8,5).

Estos resultados muestran que el mantenimiento de las condiciones óptimas de operación es más flexible, y fácil de controlar, en condiciones de aerobiosis, además de minimizarse el riesgo de acumulación de nitrito en los efluentes tratados.

La importancia de controlar estos parámetros físico-químicos ha sido descrita con anterioridad en la bibliografía. Así pues, autores como Clark *et al.* (1976); Hund *et al.* (1993); Krishnamachari y Clarkson (1993); y Walker *et al.* (1989), han resaltado la importancia de mantener un valor de pH de aproximadamente 7 durante el proceso de

desnitrificación para evitar la acumulación de nitrito en los efluentes tratados, lo cual concuerda con los datos presentados en la Tabla 29, obtenidos con *K. oxytoca* CECT 4460 en condiciones de anaerobiosis. El control de la temperatura también es un parámetro importante y su efecto sobre la eliminación de nitrato ha sido estudiado por autores como Lawson (1981) y Walker *et al.* (1989).

Se ha observado que otro factor importante, que afecta al buen funcionamiento de los sistemas de tratamiento de altas concentraciones de nitrato, es la presencia de determinados compuestos en las aguas, tales como SO_4^{2-} (Sikora y Keeney, 1976), metales pesados (Kamath *et al.*, 1992), sales (Clifford y Liu, 1993; Lawson, 1981) y carbonato cálcico (Walker *et al.*, 1989) y debe tenerse en cuenta para la aplicación práctica del proceso. En numerosas ocasiones, el efecto tóxico de los sulfatos, en este tipo de tratamientos, se produce cuando se utilizan complejas comunidades microbianas, atrapadas en biopelículas de gran grosor, en condiciones anaeróbicas. En estas condiciones las bacterias sulfato reductoras, presentes en la comunidad, encuentran las condiciones ideales de crecimiento acumulando sulfitos, los cuales inhiben la reducción de nitrito y N_2O , con la consecuente acumulación de estos metabolitos en los efluentes (Lemmer *et al.*, 1997).

En este trabajo, es importante destacar que las aguas del "canal V", no solo contienen NO_3^- sino también importantes cantidades de carbonatos y SO_4^{2-} (aproximadamente 1 g L^{-1}), las cuales no representaron un problema para la eliminación de nitrato con la utilización de las cepas de *Klebsiella* y *Arthrobacter* aisladas en este estudio, pero que si son potencialmente restrictivas para el crecimiento de microorganismos desnitrificantes.

2.2. ESCALADO A UNA PLANTA PILOTO DE 40 L DE CAPACIDAD

Uno de los factores más importantes, a la hora de hacer viable el escalado y la instalación de un sistema de depuración de aguas residuales con altas cargas de nitrógeno a nivel industrial, es el factor económico. Los principales costes del sistema son debidos a:

a) El suministro de los nutrientes, necesarios para el crecimiento de los microorganismos, al medio de cultivo.

Para minimizar este coste, en este trabajo se hicieron esfuerzos para reducir significativamente la concentración de los nutrientes suministrados al medio de cultivo. Se determinó que la concentración de micronutrientes, tales como fosfato, hierro, SO_4Mg , y elementos traza, podía ser reducida entre 1/2 y 1/100 con respecto a la concentración standard utilizada en el laboratorio, no viéndose afectado ni el crecimiento de las dos cepas utilizadas en este trabajo, ni la eficacia en la eliminación de nitrato por las mismas. Con esto, se consiguió una importante disminución en el coste total del proceso.

b) La utilización de agua para la dilución, en la mayoría de los casos, de las aguas residuales con una concentración de N-NO_3^- superior a 1000 mg L^{-1} antes de su tratamiento.

Este hecho ha sido descrito por varios autores en el tratamiento de aguas con altas cargas de nitrato, observándose que las tasas de desnitrificación alcanzadas dependieron de la concentración de nitrato presente en el influente, y por lo tanto, de la dilución a la que se sometieron las aguas a tratar. Francis y Makin (1977) describieron la inhibición de la desnitrificación a concentraciones de nitrato superiores a 6000 mg L^{-1} , en aguas residuales procedentes de la fabricación de fuel UO_2 , por lo que esta concentración no debe ser excedida para el tratamiento de este tipo de aguas y se hace necesaria la dilución de las mismas. Cuando se excedió esta concentración, se detectó nitrito en el efluente, alcanzando concentraciones de hasta 2000 mg L^{-1} . Walker y colaboradores (1989) observaron el mismo fenómeno en aguas residuales procedentes de una industria de uranio. Cuando no se diluyeron las aguas residuales (aproximadamente $6000 \text{ NO}_3^- \text{ L}^{-1}$), la desnitrificación se inhibió. Sin embargo, cuando se utilizó el 17% agua residual (alrededor de $1000 \text{ mg NO}_3^- \text{ L}^{-1}$) se alcanzó una tasa de desnitrificación de entre 6 y $8 \text{ kg N/m}^3 \text{ día}$; con 34% agua residual (aproximadamente $2000 \text{ mg NO}_3^- \text{ L}^{-1}$) se alcanzó una tasa de desnitrificación de 8 a $10 \text{ kg N/m}^3 \text{ día}$, mostrando, de esta forma, la influencia del factor de dilución de las aguas sobre la tasa de desnitrificación. Lawson, (1981) también observó la necesidad de diluir las aguas residuales (entre 1/4 y 1/10) procedentes de una industria química, no solo por el efecto tóxico del nitrato sobre los microorganismos, sino también por el efecto tóxico producido por las altas cantidades de sodio presentes en este tipo de agua, el cual ha resultado ser inhibitorio para un gran número de microorganismos anaerobios encargados de llevar a cabo la desnitrificación.

En este trabajo, es de destacar que, para el tratamiento biológico de las aguas residuales procedentes de la síntesis de DNEG, se utilizaron aguas subterráneas procedentes de uno de los pozos (pozo EBUIII) existentes en la propia fábrica, en lugar de agua desionizada, para ajustar la concentración de nitrato a los niveles óptimos deseados; ésto representó una disminución en el coste del proceso de 1 a 2 ordenes de magnitud con respecto al coste de los ensayos standard realizados en el laboratorio.

Nuestros resultados muestran que bajo condiciones aeróbicas, y diluyendo las aguas hasta alcanzar una concentración de 100 mM (6200 mg L^{-1}) de nitrato, con el suministro de una fuente de carbono asimilable, estos microorganismos son capaces de eliminar el 99% del nitrato presente en las aguas residuales procedentes de la síntesis de DNEG bajo las condiciones anteriormente citadas. Esos parámetros físico-químicos pueden ser fácilmente controlados, y el sistema muestra un buen funcionamiento, tanto en cultivos estancos como continuos, en una planta piloto de 40 L de capacidad (datos mostrados en el Capítulo II de Resultados), la cual se ha operado satisfactoriamente en la fábrica de Páramo de Masa (Burgos) perteneciente a UEE. En esta planta piloto, operada en continuo, se han logrado

tasas de eliminación de nitrato de 1,35 g N-NO₃⁻ L⁻¹ día, con una concentración inicial de nitrato en el influente de 40 mM (2480 mg L⁻¹) y utilizando una tasa de dilución (D) de 0,1 h⁻¹.

No obstante, a partir de los datos obtenidos en cultivos continuos de *K. oxytoca* CECT 4460, en los que se utilizó una concentración inicial de nitrato en el influente de 20 mM (1,24 g L⁻¹), mostrados en el capítulo III de este trabajo, se observa que la tasa de dilución puede verse incrementada a 0,2 h⁻¹, si la fuente de carbono utilizada es sacarosa, y a 0,3 h⁻¹, si la fuente de carbono utilizada es glicerol, lo que supone un aumento en la tasa de eliminación de nitrato a un valor de 2,02 g N-NO₃⁻ L⁻¹ día. Dada la tolerancia a altas concentraciones de nitrato que presenta esta cepa, y a su capacidad de crecer en cultivos estancos a concentraciones de hasta 150 mM (9300 mg L⁻¹) NO₃⁻, se predice que estas tasas de eliminación de nitrato podrían aumentarse en sistemas continuos mediante un incremento en la concentración del nitrato suministrado en el influente.

En la Tabla 30 se resumen diferentes tasas de desnitrificación, descritas en la bibliografía, para el tratamiento de aguas con altas cargas de nitrato utilizando distintos tipos de reactores.

Tabla 30. Tasas de eliminación de altas cargas de nitrato descritas en la bibliografía.

[NO ₃ ⁻] inicial (mg L ⁻¹)	Reactor	Tasa eliminación NO ₃ ⁻ (g N-NO ₃ ⁻ L ⁻¹ día)	Referencia
1000	Cultivos suspendidos estancos	0,036	Clark <i>et al.</i> , 1976
500-1500	AFEB	22	Clarkson <i>et al.</i> , 1991
	USB	4,5	
1000	PBR	5,6	Claus y Kutzner, 1985
1000	Cultivos suspendidos con agitación	4,3-5,9	Hund <i>et al.</i> , 1993
900	USB	7,2	Miyaji y Kato, 1975
—	Cultivos suspendidos con agitación	0,066	More y Schroeder, 1971
1000-6000	Lecho fluido	16-58	Pitt <i>et al.</i> , 1981
1000-2000	Lecho fluido	6-10	Walker <i>et al.</i> , 1989

Como puede observarse en la Tabla 30, las tasas de eliminación de nitrato varían dependiendo de la concentración de este compuesto en el influente a tratar, así como del tipo

de reactor utilizado, haciendo difícil la comparación entre unos sistemas y otros. No obstante, en este caso concreto, sería lógico comparar con las tasas de eliminación de nitrato obtenidas en cultivos suspendidos, las cuales oscilan entre 0,036 y 5,9 g N-NO₃⁻ L⁻¹ día.

Nuestros resultados se encuentran dentro de este intervalo, por lo que se demuestra que la utilización de la ruta asimilatoria de nitrato, para la eliminación de este compuesto en efluentes industriales, puede ser tan efectiva como la utilización de la desnitrificación.

2.3. PRODUCCION DE BIOMASA

El principal motivo por el que se desestima, en la mayoría de los casos, la utilización de la vía asimilatoria para la eliminación de nitrato en aguas residuales, se debe a la producción de una gran cantidad de biomasa, que debe ser separada de los efluentes tratados y posteriormente eliminada. Este es un factor que crea problemas medioambientales a la vez que agrava económicamente el proceso. No obstante, este factor también es un problema en los sistemas de tratamiento tradicionalmente utilizados (nitrificación-desnitrificación) con lodos activos, en donde se produce una gran cantidad de biomasa y esto genera hasta el 13% del coste operativo (Tijhuis, 1994). En las plantas de tratamiento de lodos activos, para evitar el lavado de los organismos de interés del reactor, debido al bajo crecimiento de los organismos nitrificantes, el lodo es retenido en los tanques durante un largo periodo de tiempo (24-72 horas), (Sedlak, 1991; Halling-Sorensen y Jorgensen, 1993). Esto hace necesaria la existencia de grandes tanques aireados, lo cual crea adicionales problemas de espacio en dichas plantas de tratamiento. Hay numerosos ejemplos en la bibliografía que describen los resultados, obtenidos en plantas piloto, para el tratamiento de aguas residuales procedentes de distintas industrias, mediante nitrificación-desnitrificación, en los que se muestran valores de biomasa de entre 3,5 y 5 g L⁻¹ (Ganczarzyk, 1979; Heijnen, 1991; 1993; Shade, 1977; Tijhuis, 1994; Williams *et al.*, 1986), e incluso superiores, de hasta 18 g L⁻¹. (Sakai, *et al.*, 1997).

Nuestros resultados muestran concentraciones de biomasa de entre 3 y 9 g L⁻¹ y de entre 3 y 20 g L⁻¹, para *K. oxytoca* CECT 4460 y *A. globiformis* CECT 4500 respectivamente, en cultivos estancos. En cultivos continuos la biomasa obtenida cuando se utilizó *K. oxytoca* CECT 4460 fue de entre 3 y 5 g L⁻¹, y de alrededor de 5 g L⁻¹ cuando se utilizó *A. globiformis* CECT 4500. Estos valores son comparables a los obtenidos en los procesos de nitrificación-desnitrificación mediante la utilización de lodos activos descritos en la bibliografía.

En los ensayos realizados en la planta piloto de 40 L de capacidad, se observó una tendencia a la disminución en los valores de la biomasa en suspensión determinada en cultivos continuos de *A. globiformis* CECT 4500. Este hecho se debió a la tendencia natural de esta cepa a formar agregados cuando se expuso a nitrato (ver Figura 10). Esto supuso una ventaja en la utilización de *A. globiformis* CECT 4500 sobre *K. oxytoca* CECT 4460 en el

sistema de eliminación de nitrato, pues facilitó la sedimentación de las células, una vez que el efluente fue tratado, incluso sin la adición de floculantes. Dado que las bacterias recuperadas en el efluente conservaban todas sus propiedades con respecto a la tolerancia a nitrato y la eliminación del mismo, el funcionamiento del proceso en continuo se predice satisfactorio por largos periodos de tiempo con esta cepa.

En este trabajo se quiere hacer énfasis en que, aunque la producción de biomasa pueda ser una desventaja con respecto al sistema de desnitrificación tradicionalmente utilizado, existen, en este caso en concreto, motivos suficientes, tales como la composición específica de las aguas del "Canal V", donde se encuentran compuestos potencialmente inhibidores de la desnitrificación, la alta tolerancia a nitrato mostrada por *K. oxytoca* CECT 4460 y *A. globiformis* CECT 4500 y la capacidad de eliminar el 99% del nitrato suministrado sin acumulación de nitrito (o cualquier otro metabolito tóxico), en los efluentes tratados en condiciones de aerobiosis, que justifican la elección de la ruta asimilatoria de nitrato para el tratamiento de las aguas procedentes de la síntesis de DNEG. También se demuestra que la utilización de la ruta asimilatoria de nitrato para su aplicación práctica en la eliminación de altas cargas de nitrato, procedentes de actividades industriales, puede ser una alternativa útil a la desnitrificación en aquellos casos en que las aguas a tratar contienen determinados componentes inhibitorios para los organismos anaerobios desnitrificantes, en este caso concreto SO_4^{2-} , además de un escaso o nulo contenido en materia orgánica.

Es importante resaltar que, previamente, se describió en este grupo de trabajo una cepa perteneciente al género *Arthrobacter* denominada AH2, que fue capaz de eliminar más de 1,2 g L⁻¹ DNEG en 24 horas en las mismas aguas residuales, y que este proceso fue facilitado por la presencia de microorganismos capaces de eliminar nitrato (Ramos *et al.*, 1996). Un consorcio estable ha sido establecido en la fábrica, el cual está actualmente operando en continuo y ha logrado la total eliminación de nitrato y DNEG.

3. EFECTO DE LA FUENTE DE CARBONO SOBRE LA ELIMINACION DE NITRATO Y DETERMINACION DE LA RAZON OPTIMA C/N

Además de los costes económicos discutidos en el apartado 2.2. de esta Sección, hay que resaltar que el principal coste económico de los sistemas de eliminación de nitrato, en aguas residuales con un bajo contenido en materia orgánica, es debido a la adición exógena de una fuente de carbono (Blaszczyk *et al.*, 1981; 1985; Mycielski *et al.*, 1983;). En este trabajo, se llevaron a cabo dos estrategias para reducir este coste: la primera fue la utilización de materias primas de fábrica, tales como glicerol y etilenglicol, las cuales se utilizaron para el aislamiento de los microorganismos del suelo; la segunda fue la utilización de fuentes de

carbono alternativas de menor coste económico, entre las que se utilizaron residuos agrícolas (melazas) y sacarosa.

Nuestros resultados muestran que es viable utilizar melazas como única fuente de carbono para la eliminación de nitrato por *K. oxytoca* CECT 4460 y *A. globiformis* CECT 4500. La elección de melazas de remolacha se debe a la mayor facilidad de manipulación de este residuo con respecto al obtenido de la caña de azúcar. Para una total eliminación del nitrato suministrado (20 mM), sin producción de nitrito, fue necesaria la adición de 4% (p/v) de melazas al medio de cultivo (ver Tablas 21 y 22). La posibilidad de utilizar residuos agrícolas (melazas), o industriales (efluentes de destilerías de alcohol) como fuente de carbono para la eliminación de altas concentraciones de nitrato, en aguas residuales industriales, ha sido descrito previamente por Bernet *et al.* (1996) y Pitt *et al.* (1981).

La sacarosa se eligió porque, de entre los azúcares utilizados por *Klebsiella oxytoca* CECT4460, resultó ser la de más bajo coste económico y por encontrarse presente en más de un 50%(p/p) en las melazas. La cinética de crecimiento de *K. oxytoca* CECT 4460, así como la eficacia del sistema de eliminación de nitrato, fueron estudiados tanto en cultivos estancos como continuos utilizando sacarosa y/o glicerol.

3.1. CINÉTICA DEL CRECIMIENTO DE *KLEBSIELLA OXYTOCA* CECT 4460 EN CULTIVOS ESTANCOS

Cuando se utilizó sacarosa como única fuente de carbono en cultivos estancos, los rendimientos obtenidos fueron similares a los observados con glicerol, pero una importante cantidad de nitrito se acumuló en el medio de cultivo (datos no mostrados), por esta razón se decidió estudiar la cinética de crecimiento de *K. oxytoca* CECT 4460 con sacarosa y/o glicerol y comparar el comportamiento mostrado por esta cepa, con respecto a la utilización de estas fuentes de carbono, dependiendo de su cultivo en sistemas estancos o continuos.

En la bibliografía se recogen un gran número de estudios realizados en cultivos estancos en presencia de mezclas de nutrientes que sirven para la misma función fisiológica. Estos estudios se han centrado principalmente en el fenómeno de la diauxia. En general, el comportamiento del crecimiento diáuxico ha sido investigado con microorganismos heterótrofos, creciendo en presencia de dos fuentes de carbono y energía, y se han descubierto los mecanismos moleculares para la síntesis y regulación de la actividad de los enzimas implicados para múltiples combinaciones de substratos (Harder y Dijkhuizen, 1982; Magasanik y Neidhardt, 1987). No obstante, cuando los microorganismos hacen frente a dos o más fuentes de carbono y energía simultáneamente, no siempre el resultado es un crecimiento diáuxico. El comportamiento de los microorganismos cuando se exponen a mezclas de diferentes fuentes de carbono en cultivos estancos está influenciado por tres factores:

a) La combinación de los substratos presentes en la mezcla.

En relación a este punto, hay muchos casos descritos, como el de una levadura metilotrófica en la que la síntesis de los enzimas para el catabolismo del metanol se encontraron fuertemente reprimidos en presencia de glucosa (Sahm y Wagner, 1973), resultando en un crecimiento diáuxico cuando las células se expusieron a mezclas de glucosa y metanol. Por el contrario, durante el crecimiento exponencial en metanol más otra fuente de carbono, como glicerol, sorbitol o xilosa, se observó la desrepresión de los enzimas involucrados en el catabolismo del metanol (Eggeling y Sahm, 1978); como resultado esta levadura utilizó simultáneamente metanol y glicerol durante el crecimiento exponencial en cultivos estancos.

b) La concentración a la que se encuentren los substratos en la mezcla.

Es un hecho conocido que en quimiostatos limitados en carbono, donde las concentraciones residuales de carbono se encuentran, generalmente, en un valor de $\mu\text{g L}^{-1}$, las combinaciones de substratos que en cultivos estancos son incompatibles y resultan en un crecimiento diáuxico, son utilizados simultáneamente a tasas de dilución bajas. Ejemplos de microorganismos heterótrofos incluyen a *Escherichia coli* creciendo con mezclas de glucosa y fructosa o glucosa y lactosa (Mateles et al., 1967; Silver y Mateles, 1969), *Paracoccus denitrificans* creciendo con manitol y metanol (Van Verseveld et al., 1979), o las levaduras *Hansenula polymorfa* y *Kloeckera* sp. 2201 creciendo con glucosa y metanol (Egli et al., 1982; 1986). Así pues, cabe especular que la utilización simultánea de estas fuentes de carbono no solo tienen lugar en quimiostatos bajo condiciones de estado de equilibrio dinámico, sino también bajo condiciones fluctuantes (de estado transitorio), e incluso en cultivos estancos a bajas concentraciones de substrato. Hay ejemplos, como *E. coli* creciendo en cultivos estancos con mezclas de glucosa y galactosa, como fuentes de carbono, a diferentes concentraciones de ambos substratos (Senn, 1989). La cepa utilizada mostró un crecimiento diáuxico a altas concentraciones de estos substratos (100 mg L^{-1}). No obstante, cuando la concentración inicial de ambos azúcares fue $\leq 10 \text{ mg L}^{-1}$, se observó un cambio gradual del comportamiento, de diáuxico a secuencial, y finalmente un consumo simultáneo de ambos substratos (Senn, 1989). Este hecho también ha sido observado en *Pseudomonas* sp. por Shmidt y Alexander (1985).

c) Las condiciones de cultivo de las células utilizadas como inóculo.

Uno de los ejemplos mejor estudiados es el de *Pseudomonas oxalaticus* creciendo en un medio con oxalato y formato (Dijkhuizen et al., 1980). La utilización simultánea de oxalato y formato solo se observó cuando las células fueron precultivadas en oxalato.

En este trabajo se ha estudiado el efecto de las condiciones de cultivo de células de *K. oxytoca* CECT 4460 utilizadas como inóculo para cultivos estancos con mezclas de sacarosa

y glicerol. Las células utilizadas se precultivaron por separado en cada una de estas fuentes de carbono. Independientemente de la fuente de carbono utilizada para precultivar las células, la curva de crecimiento observada fue diáuxica (ver figuras 22 e 23). Ambas fuentes de carbono fueron utilizadas simultáneamente durante las dos primeras horas del ensayo, observándose, posteriormente, un consumo secuencial con la utilización preferencial de sacarosa. Este hecho fue sorprendente, puesto que en cultivos diáuxicos, el substrato que soporta la tasa de crecimiento más alta es, generalmente, utilizado en primer lugar, mientras que el consumo del segundo substrato está reprimido (Harder, 1982). No obstante, con *Klebsiella oxytoca* CECT 4460 se observó un comportamiento contrario al general: el primer substrato utilizado fue sacarosa, el cual soporta una tasa de crecimiento ($\mu = 0,3 \text{ h}^{-1}$) más baja que la soportada por glicerol ($\mu = 0,45 \text{ h}^{-1}$).

El consumo simultáneo durante las dos primeras horas del ensayo dio lugar a una tasa específica de crecimiento ($\mu=0,49 \text{ h}^{-1}$) en la primera fase del crecimiento diáuxico, la cual es superior a la que soporta la sacarosa cuando es utilizada como única fuente de carbono. En cultivos estancos, el efecto sinérgico de la utilización simultánea de más de una fuente de carbono por diferentes microorganismos ha sido descrito en condiciones de exceso de substrato; en estos casos la tasa de crecimiento (μ) se ve incrementada por el consumo simultáneo de una segunda fuente de carbono con respecto a la tasa de crecimiento que soportaría utilizándose una única fuente de carbono (Babel, 1982; Egli, 1995; Ramakrishna *et al.*, 1996).

La represión catabólica ha sido descrita como uno de los principales mecanismos responsables del uso preferencial de una fuente de carbono determinada (Magasanik, 1970; Duetz *et al.*, 1994; Egli, 1995). Nuestros resultados indican que, el uso preferencial de sacarosa sobre el de glicerol, incluso cuando la primera soporta una tasa de crecimiento (μ) menor que el segundo, podría estar originado por la glucosa resultante de la hidrólisis de la sacarosa, la cual podría estar ejerciendo una represión catabólica sobre el metabolismo del glicerol (ver Figura 24).

3.2. CINÉTICA DEL CRECIMIENTO DE *KLEBSIELLA OXYTOCA* CECT 4460 EN CULTIVOS CONTINUOS

Un gran número de investigaciones han mostrado, como se ha mencionado anteriormente, que durante el crecimiento en quimiostatos limitados en carbono, la utilización simultánea de substratos, que normalmente provocan diauxia en cultivos estancos, es probablemente la norma en condiciones de crecimiento similares a las encontradas en ecosistemas naturales.

Estudios sistemáticos en quimiostatos han mostrado que la concentración residual de compuestos individuales fue consistentemente menor durante el crecimiento con mezclas de varios substratos que durante el crecimiento con un único substrato (Egli *et al.*, 1993). La

reducción de la concentración residual de un determinado sustrato, presente en una mezcla de compuestos, en cultivos continuos bajo condiciones de estado de equilibrio dinámico es dependiente de la proporción de los sustratos en la mezcla, de la naturaleza de los sustratos mezclados, y del patrón de regulación de los enzimas implicados para su utilización (Egli *et al.*, 1993). Este fenómeno ha sido observado con diversos microorganismos (Egli *et al.*, 1993; Lendenmann *et al.*, 1996) cultivados en quimiostatos con diferentes mezclas de carbono; este hecho quizás refleje que en la naturaleza, los microorganismos hacen frente a múltiples fuentes de carbono a bajas concentraciones, y sugiere que, bajo estas condiciones las fuentes de carbono se usan más eficientemente. De este modo, se explicaría por qué los microbios crecen relativamente rápido a las bajas concentraciones de sustratos encontradas en la naturaleza. La implicación de este fenómeno con respecto a la competencia de los microorganismos ha sido discutida por Gottschal (1993).

En este trabajo, cuando se utilizaron mezclas de sacarosa y glicerol en cultivos continuos a $D=0,2\text{ h}^{-1}$, se observó que la concentración residual de ambos sustratos fue menor que la concentración correspondiente en cultivos en los que solo uno de ellos fue suministrado (ver Tabla 26), confirmandose pues, una vez más, la observación realizada por Egli y colaboradores.

Otro fenómeno observado, y que marcó una diferencia clara entre el comportamiento de *K. oxytoca* CECT 4460 cuando se cultivó en sistemas estancos o continuos, fue la ausencia de nitrito en los efluentes tratados en sistemas continuos cuando se utilizó sacarosa como única fuente de carbono, utilizándose células que habían sido adaptadas en quimiostatos a concentraciones crecientes de sacarosa. Este hecho tiene una gran relevancia, desde el punto de vista económico, para la viabilidad del sistema de eliminación de nitrato presentado en este trabajo, puesto que abre la posibilidad de utilizar sacarosa como única fuente de carbono a nivel industrial, y disminuir significativamente el coste total del proceso.

3.3. DETERMINACION DE LA RAZON C/N OPTIMA PARA EL SISTEMA DE ELIMINACION DE ALTAS CARGAS DE NITRATO

El siguiente paso, para conseguir los objetivos trazados en este trabajo, fue la determinación de la razón óptima C/N necesaria para el proceso de eliminación de nitrato utilizando sacarosa como única fuente de carbono y energía. Este es un parámetro crítico en los sistemas de eliminación de nitrato, puesto que solo una apropiada razón C/N impide la acumulación de metabolitos no deseados en el efluente (Clifford y Liu, 1993). A través de datos existentes en la bibliografía se sabe que, la limitación simultánea del crecimiento microbiano por dos o más nutrientes no homólogos es un hecho generalizado (Egli, 1991), y ha sido descrito para varios nutrientes. Cooney *et al.* (1976) lo describen para nitrógeno y fósforo; Hueting y Tempest (1979) para carbono y nitrógeno, y para carbono y fósforo;

Harrison (1972) y Hamer *et al.* (1975) para nutrientes gaseosos, y Egli (1982) para carbono y nitrógeno.

La existencia de una zona de doble limitación del crecimiento por C y N (o “zona de transición”) entre la limitación individual ejercida por cada uno de estos nutrientes en quimiostatos, ha sido claramente demostrada en bacterias y levaduras en base a los parámetros de cultivo y a las características fisiológicas de las células creciendo en estas condiciones (Duchars y Attwood, 1989; Egli y Quayle, 1984; 1986; Egli, 1991; Gräzer-Lamper *et al.*, 1986; Minkevich *et al.*, 1988; Rutgers *et al.*, 1990). La extensión y forma de la zona de transición es dependiente de la razón C:N en el medio de cultivo, así como de la tasa de dilución (D), tal y como lo demuestran los datos obtenidos por Egli (1991) con *Klebsiella pneumoniae* creciendo en un quimiostato con glicerol y NH_4^+ como únicas fuentes de carbono y nitrógeno respectivamente (Figura 37). La determinación de la zona de transición se puede realizar teóricamente, a través de los datos del rendimiento obtenido para C y N en las zonas de limitación para cada uno de estos substratos, así como empíricamente a través de los datos de cultivo y de la composición de la biomasa celular (Egli, 1991).

En este trabajo se procedió a la determinación empírica de la zona de doble limitación del crecimiento por C y N. Los datos de las Tablas 25 y 27 reflejaron que cultivos continuos de *K. oxytoca* CECT 4460 llegaban a estar limitados en C o N dependiendo de la tasa de dilución (D). Cuando los ensayos se realizaron a una tasa de dilución de $D=0,1 \text{ h}^{-1}$ (Figura 26A) se distinguieron tres regímenes de crecimiento diferentes:

a) Una zona de limitación de sacarosa, donde existe un exceso en nitrato, cuando la razón C/N fue menor de 10.

b) Una zona de limitación de nitrato, donde existe un exceso en sacarosa, cuando la razón C/N fue mayor de 30.

c) Un régimen intermedio donde ambos, sacarosa y nitrato, se encontraron por debajo del límite de detección, cuando la razón C/N fue de entre 10 y 30.

Dentro de la zona de transición, se observó un incremento en la medida del carbono orgánico disuelto (DOC) en el medio de cultivo (Figura 26B). Este incremento en la medida de DOC coincidió con la acumulación en el medio de cultivo de acetato. La excreción de metabolitos al medio de cultivo, y la influencia del pH existente en el medio sobre este fenómeno, ha sido descrito con anterioridad por Wanner y Egli (1990) en cultivos estancos de *Klebsiella pneumoniae*, donde aproximadamente entre un 5 y un 10 % del carbono metabolizado fue excretado en forma de acetato cuando el pH fue de entre 6,8 y 7,3; cuando el pH fue 6 el metabolito principal fue piruvato. Además se observó la presencia de altas concentraciones de DOC cuya composición no fue determinada (Wanner y Egli, 1990).

En este trabajo también se ha estudiado si *K. oxytoca* CECT 4460 acumula polímeros de reserva en condiciones de limitación de nitrato, sacarosa, o ambos. Para ello se determinó el contenido en C y N de la biomasa obtenida para cada razón C/N estudiada (datos no mostrados). Se observó que la proporción de C y N en la biomasa permaneció constante

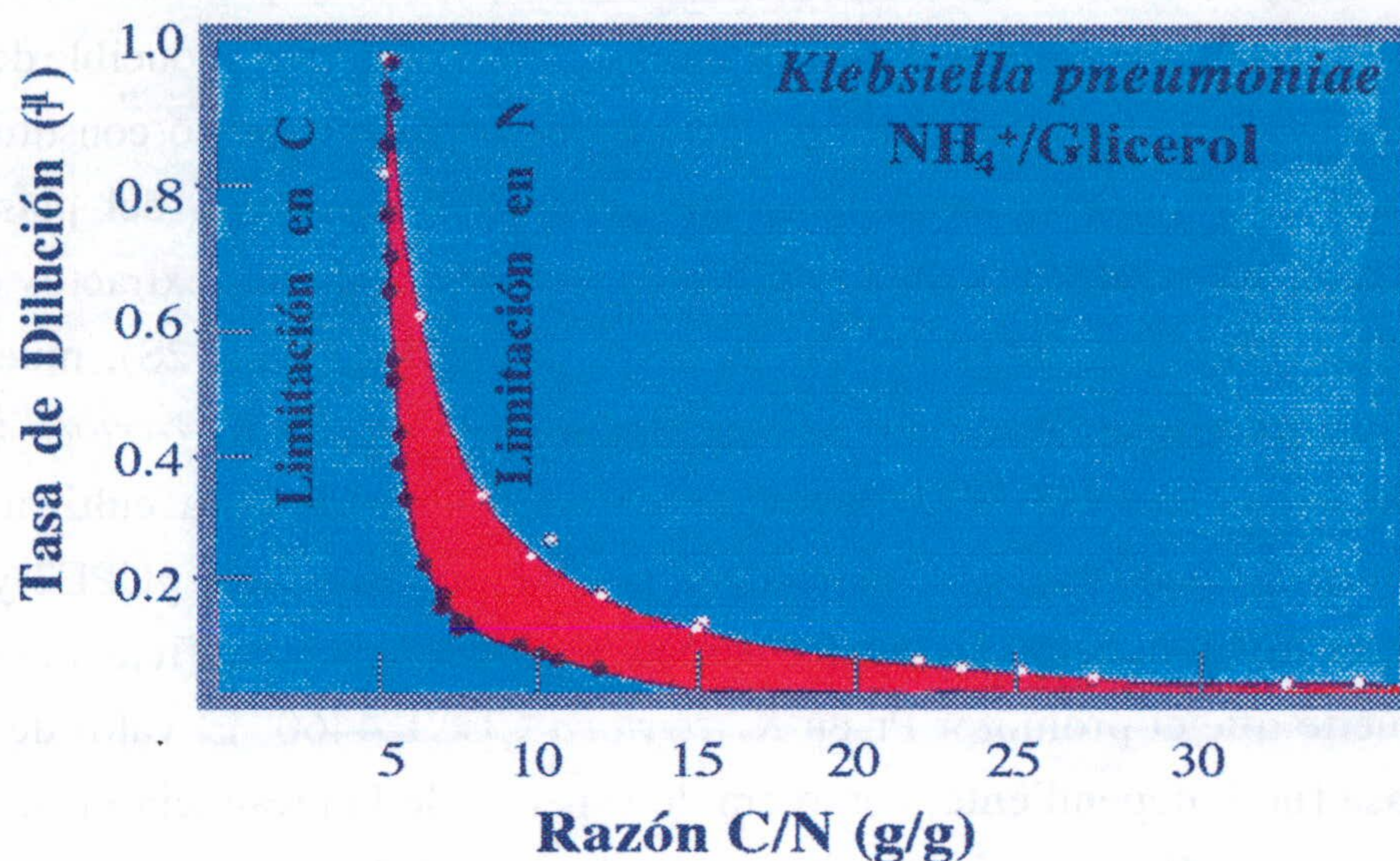
para cada razón C/N estudiada, indicando que no se produjo acumulación de polímeros de reserva.

Cuando los ensayos se realizaron utilizando una tasa de dilución de $0,2 \text{ h}^{-1}$ (Figura 27) se observó una limitación simultánea del crecimiento por sacarosa y nitrato cuando la razón C/N fue de entre 8 y 11. Los datos obtenidos para la determinación de la zona de doble limitación del crecimiento de *K. oxytoca* CECT 4460 por C y N, creciendo en quimiostatos con sacarosa y NO_3^- , cuando se utilizó una tasa de dilución de $0,1 \text{ h}^{-1}$, así como cuando se utilizó una tasa de dilución de $0,2 \text{ h}^{-1}$, concuerdan con la zona de doble limitación del crecimiento por C y N determinada por Egli (1991) para *K. pneumoniae* creciendo en quimiostatos con glicerol y NH_4^+ como única fuente de carbono y nitrógeno a distintas tasas de dilución (D) (Figura 37). En ambos casos, la zona de doble limitación de nutrientes para C y N resultó ser más estrecha y desplazada hacia una razón C/N más baja a medida que se aumentó la tasa de dilución. Este hecho ha sido descrito por Egli (1991).

La existencia de estos tres regímenes de crecimiento para C y N, hace posible su utilización para múltiples propósitos. Se sabe que las células que crecen dentro de la zona de transición se caracterizan por una potencial variabilidad en su composición celular, con respecto a los componentes celulares y a los enzimas expresados, lo cual aumenta la flexibilidad y versatilidad del metabolismo celular. El cultivo de células en sistemas continuos bajo estas condiciones, teniendo en cuenta la razón C/N y la tasa de (D), se está utilizando para la producción de determinados metabolitos, tales como poli(3-hidroxicanoatos) (Huijberts y Eggiink, 1996). Con respecto al tratamiento de aguas residuales, la existencia de esta zona de transición conlleva a la eliminación simultánea de compuestos carbonaceos y nitrogenados. En este estudio, la determinación de la zona de doble limitación de nutrientes para C y N ha supuesto el conocimiento del intervalo (para la razón C/N y la tasa de dilución) óptimo para la eliminación de nitrato por *K. oxytoca* CECT 4460. A tasas de dilución de entre $0,1 \text{ h}^{-1}$ y $0,2 \text{ h}^{-1}$, y utilizando una razón C/N de entre 8 y 10 tanto la sacarosa como el nitrato suministrados al medio de cultivo fueron totalmente consumidos y no se detectó acumulación de nitrito, amonio o acetato en el efluente tratado.

Estos datos fueron confirmados con la "técnica del pulso", la cual ha mostrado ser muy útil para la validación de datos, y para la identificación de la respuesta del crecimiento y la producción de metabolitos a los componentes introducidos durante la inyección. Esta técnica es ampliamente utilizada para la optimización de medios de cultivo utilizados para producción de metabolitos (Guardia Alba *et al.*, 1996; Yee y Blanch, 1993).

Figura 37. Influencia de la razón C/N del medio de cultivo suministrado y la tasa de dilución (D) sobre la extensión y forma de la zona de doble limitación del crecimiento por C y N.



Klebsiella pneumoniae se cultivó en quimiostatos con glicerol y NH_4^+ como únicas fuentes de carbono y nitrógeno a las distintas tasas de dilución (D) indicadas. (datos recogidos por Egli, 1991).

4. MEJORA GENÉTICA DE *KLEBSIELLA OXYTOCA* CECT 4460 PARA FAVORECER LA ELIMINACION DE ALTAS CARGAS DE NITRATO

Klebsiella oxytoca CECT 4460 fue capaz de eliminar altas concentraciones de nitrato sin acumulación de nitrito en el efluente cuando las condiciones de cultivo fueron las optimizadas en el Capítulo 1 de Resultados. No obstante, bajo determinadas condiciones de cultivo y especialmente dependiendo del substrato utilizado como fuente de carbono, *K. oxytoca* CECT 4460 acumuló nitrito en el efluente tratado. Una posible interpretación para este fenómeno es que la reducción de nitrato a nitrito es más rápida que la reducción de nitrito a amoníaco en esta cepa. Esta situación refleja una posible limitación en el funcionamiento de la actividad nitrito reductasa.

Para disminuir el riesgo de una posible acumulación de nitrito en los efluentes tratados, se procedió a la mejora genética de *K. oxytoca* CECT 4460 mediante un aumento en la dosis génica de nitrito reductasa, transfiriendo a esta cepa el gen *nasB* de *Klebsiella pneumoniae*, el cual codifica la nitrito reductasa asimilatoria (Lin *et al.*, 1993).

Con esta finalidad se llevaron a cabo dos estrategias:

4.1 LA CONSTRUCCION DE PLASMIDOS DE AMPLIO ESPECTRO DE HUESPED, QUE PORTAN EL GEN *nasB* DE *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*.

En este trabajo se construyeron dos plásmidos, pUPE2 y pUPE3. En el plásmido pUPE2 el gen *nasB* se expresó a partir del promotor Plac, (promotor inducible del operón de la lactosa) (Figura 30), y en el plásmido pUPE3 el gen *nasB* se expresó constitutivamente a partir de Pr (dos promotores constitutivos en tandem del gen *xyIR* del plásmido TOL) (Figura 31). Las medidas de actividad nitrito reductasa realizadas en extractos celulares de *K. oxytoca* CECT 4460 portando cada uno de estos plásmidos (Tabla 28), muestran que la mayor actividad nitrito reductasa se obtuvo en extractos celulares de *K. oxytoca* CECT 4460 (pUPE2), independientemente de la fuente de carbono utilizada para cultivar las células (sacarosa o glicerol). Dado que el número de copias de los plásmidos pUPE2 y pUPE3 es similar, el mayor nivel de actividad nitrito reductasa probablemente refleje que el promotor Plac es más fuerte que el promotor Pr en *K. oxytoca* CECT 4460. El valor de la actividad nitrato reductasa fue independiente, como era de esperar, de la presencia de los plásmidos que portaban el gen *nasB*, y fue siempre superior a la actividad nitrito reductasa.

Para determinar si la presencia del plásmido pUPE2 en *K. oxytoca* CECT 4460, reducía la acumulación de nitrito en el medio de cultivo con respecto a la cepa silvestre, se estudió la acumulación de metabolitos en el medio de cultivo y se observó un comportamiento secuencial en la ruta de asimilación de nitrato a amoníaco (ver Figura 32). El consumo de nitrato fue similar tanto en la cepa silvestre como en la portadora del plásmido pUPE2, no obstante, los niveles de nitrito acumulado en el medio de cultivo, tras la reducción del nitrato, fueron diferentes dependiendo de la presencia de la dosis extra de nitrito reductasa en las células. En el sobrenadante de la cepa silvestre se acumuló de un 80 a un 90% más nitrito que en el sobrenadante de la cepa portadora del plásmido pUPE2. Posteriormente, el nitrito acumulado fue reducido a amonio, el cual se acumuló transitoriamente en el medio de cultivo en mayor cantidad en el sobrenadante de la cepa portadora del plásmido pUPE2, con un nivel de aproximadamente el doble del observado en el sobrenadante de la cepa silvestre. Una vez que el nitrito fue totalmente consumido, el amonio acumulado en el medio de cultivo fue asimilado por ambas cepas (Figura 32).

Este fenómeno secuencial en la reducción de nitrato ha sido también observado en la desnitrificación de nitrato, dándose la acumulación transitoria de cada uno de los metabolitos. Hay varios casos descritos en la bibliografía que hacen especial mención a especies del género *Pseudomonas*. Williams y colaboradores (1978) observaron dos fases claramente diferenciadas en la desnitrificación de nitrato en cultivos de *P. stutzeri*. En la primera fase, el nitrato fue totalmente reducido a nitrito, mientras que en la segunda fase el nitrito fue reducido a óxidos de nitrógeno. La nitrato reductasa fue activa desde el principio, mientras que la nitrito reductasa fue sintetizada y activa tras 12 horas, observándose una fase lag entre ambas. Una vez comenzado el proceso de reducción de nitrito, la actividad nitrito

reductasa de *P. stutzeri* fue totalmente suprimida por la adición de nitrato al medio de cultivo, siendo restaurada una vez que el nitrato fue totalmente eliminado. Blaszczyk (1992) también observó este comportamiento secuencial, con la consiguiente acumulación de nitrito en el medio de cultivo, utilizando cultivos puros de *P. stutzeri* y *P. aeruginosa*, describiendo, al igual que Williams y colaboradores, que existe una fase lag al comienzo de la reducción de nitrito en ambas cepas. En dicho trabajo, se especulan dos razones que podrían dar lugar a ese fenómeno: a) el efecto inhibitorio del nitrato sobre la inducción de la síntesis de la nitrito reductasa, y b) una fase lag de larga duración necesaria para la adaptación enzimática a nitrito. Como resultado se observó una actividad enzimática desbalanceada durante el cultivo de *Pseudomonas* spp.

Otro ejemplo ha sido descrito por Baumann *et al.* (1996; 1997) utilizando cultivos puros de *Paracoccus denitrificans* sometidos a ciclos alternantes de aerobiosis y anaerobiosis, en donde se ha observado que las diferentes enzimas para la desnitrificación no están inducidas simultáneamente, sino secuencialmente, acumulándose nitrito, NO y N₂O en los efluentes (Baumann *et al.*, 1996). También describen que la nitrito reductasa es el enzima crítico en el desarrollo de la desnitrificación llevada a cabo por *P. denitrificans*. El enzima aparece inducido más tardíamente que la nitrato reductasa o la N₂O reductasa.

En nuestros resultados no parece observarse una fase lag en cuanto a la actividad de la nitrito reductasa, pero si se observa una tendencia en el nivel de la actividad nitrito reductasa, determinado en células permeabilizadas de *K. oxytoca* CECT 4460 y *K. oxytoca* CECT 4460 (pUPE2), a disminuir con el tiempo (Fig. 32C), siendo de entre un 50% a un 30% más bajo al final que al principio del ensayo. No obstante, el nivel de la actividad nitrito reductasa en *K. oxytoca* CECT 4460 (pUPE2) fue siempre superior al nivel de la actividad nitrito reductasa en células permeabilizadas de la cepa silvestre, en concordancia con los resultados obtenidos en los extractos celulares. También se determinó la actividad nitrato reductasa (datos no mostrados) en células permeabilizadas y se observó que su valor fue similar en ambas cepas siendo éste superior al valor determinado para la nitrito reductasa. Esta alta tasa de reducción de nitrato podría dar lugar a una acumulación interna de nitrito, posiblemente debido a una menor eficiencia en la reducción o en el transporte de nitrito, dando como resultado la acumulación de nitrito en el medio de cultivo.

Este hecho también ha sido observado en ciertos microorganismos desnitrificantes, como *Alcaligenes* y *Pseudomonas*, los cuales sintetizan la nitrito reductasa a una tasa más baja que la nitrato reductasa (Betlach y Tiedje, 1981; Krishnamachari y Clarkson, 1993), y esto conlleva a la acumulación de nitrito en los efluentes tratados.

Dada la inestabilidad del plásmido pUPE2 en *K. oxytoca* CECT 4460 cuando ésta cepa fue cultivada en ausencia de presión selectiva (Km) (ver Figura 33), se planteó la segunda estrategia para la consecución de este objetivo.

4.2. INTRODUCCION DE LA COPIA EXTRA DE *nasB* EN EL CROMOSOMA DE *K. OXYTOCA* CECT 4460.

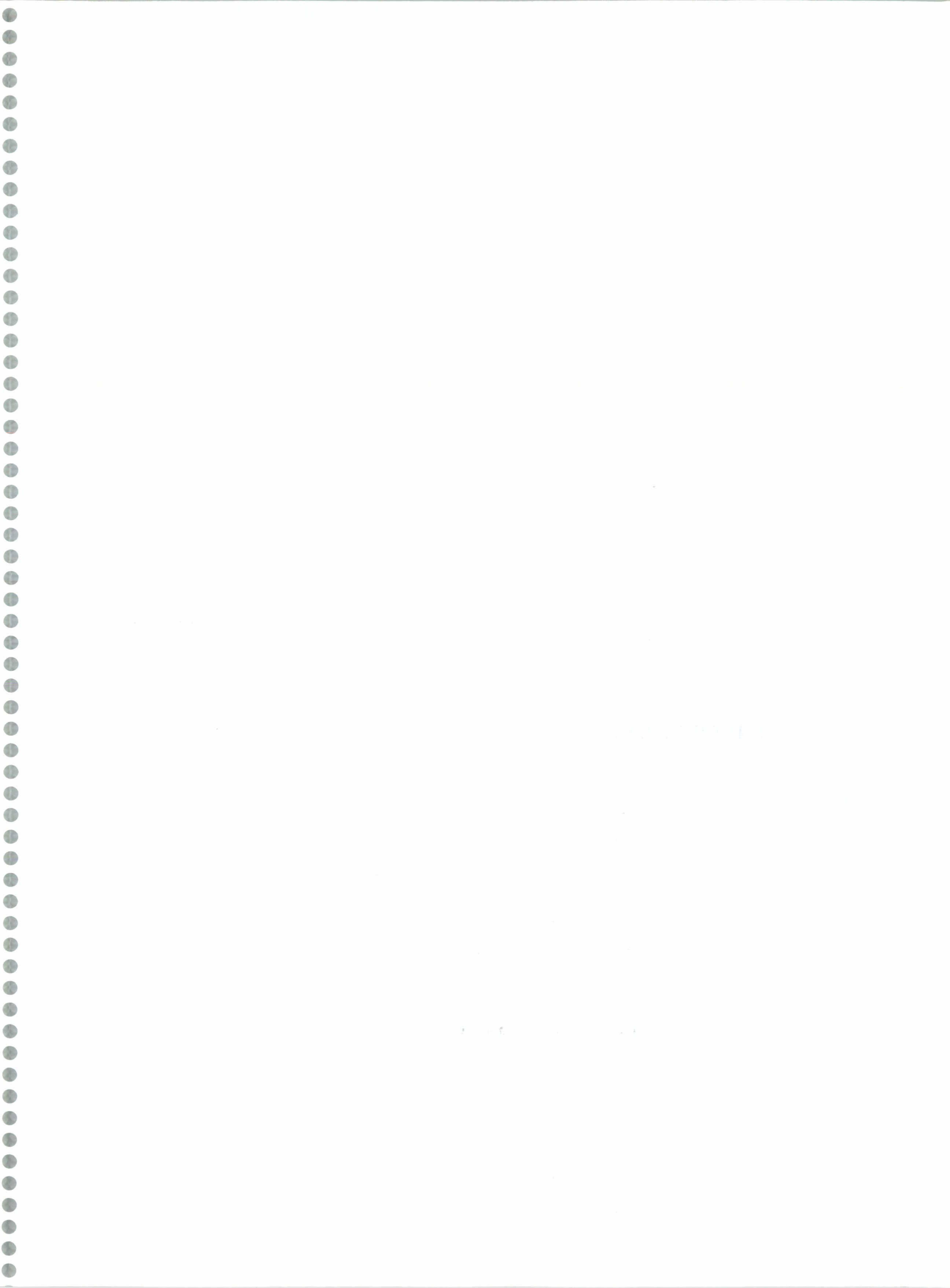
Para la transferencia del gen *nasB* al cromosoma de *K. oxytoca* CECT 4460, se utilizó el plásmido pUT mini-Tn5 Km1, que lleva un mini-Tn5 que contiene resistencia a Km, y un único sitio *NotI* de clonación (de Lorenzo *et al.*, 1990). Los minitransposones son ampliamente utilizados en ingeniería genética de microorganismos en los cuales se requiere mantener un fenotipo recombinante de forma estable, en ausencia de presión selectiva, especialmente en la construcción de microorganismos manipulados genéticamente para ser liberados al medio ambiente (de Lorenzo y Timmis, 1994).

En este trabajo, el gen *nasB* se clonó dentro del mini-Tn5, en ambas orientaciones con respecto al promotor de la Km, dando como resultado los plásmidos pUPE5a y pUPE5b, los cuales se utilizaron para la transferencia del gen *nasB* al cromosoma de *K. oxytoca* CECT 4460. Los ensayos de hibridación de ADN realizados para confirmar el mantenimiento de la copia extra del gen *nasB* en el cromosoma de las cepas receptoras del minitransposon, utilizando como sonda el gen *nasB* de *K. pneumoniae*, mostraron que en la cepa silvestre, los genes que codifican las enzimas responsables de la asimilación de nitrato están localizados en un fragmento de 17 Kb *HindIII*, como es el caso de *K. pneumoniae* (Lin *et al.*, 1993; 1994), apareciendo una sola banda de hibridación (ver Figura 35). Por el contrario, la cepa recombinante seleccionada, denominada GP1 mostró 2 copias del gen *nasB*, independientemente de la presencia o ausencia de Km en el medio de cultivo, indicando que la copia extra del gen *nasB* se mantiene de forma estable en el cromosoma de *K. oxytoca* CECT 4460.

El clon recombinante GP1, mostró una reducción en la acumulación de nitrito del 25% con respecto al clon silvestre (ver Figura 36); no obstante, no se alcanzó una reducción del nitrito en el medio de cultivo tan eficiente como la alcanzada con la cepa portadora del plásmido pUPE2 (ver Figura 32B).

Estos resultados indican que es posible la mejora genética de *K. oxytoca* CECT 4460 mediante las dos estrategias mencionadas arriba. La aplicación práctica de las cepas manipuladas genéticamente, por uno u otro medio, abre nuevas expectativas en cuanto al tratamiento de aguas residuales con altas cargas de nitrato, ya que permitiría disminuir el riesgo de acumulación de nitrito en los efluentes, siendo éste el factor limitante en el tratamiento de este tipo de aguas.

CONCLUSIONES



Los resultados obtenidos en este trabajo permiten extraer las conclusiones que se exponen a continuación:

1. Las cepas *Klebsiella oxytoca* CECT4460 y *Arthrobacter globiformis* CECT 4500, aisladas de suelos contaminados con nitrato, son tolerantes a concentraciones de hasta 1M de nitrato y son capaces de usar este compuesto como única fuente de nitrógeno a concentraciones de hasta 175 mM.

2. La eliminación de nitrato por *K. oxytoca* CECT 4460 y *A. globiformis* CECT 4500 ocurre sin acumulación de nitrito en el medio de cultivo, lo cual representa una ventaja significativa sobre los organismos desnitrificantes capaces de reducir nitrato a concentraciones similares, ya que estos cultivos siempre acumulan nitrito.

3. Las condiciones óptimas, entendiéndolas como las necesarias para obtener la fase lag de crecimiento más corta, el crecimiento más rápido, y el mayor consumo de nitrato, fueron las siguientes: agitación ≥ 400 rpm, temperatura $27,5 \pm 2,5$, y pH $7 \pm 0,5$. El rendimiento para C y N fue máximo para *K. oxytoca* CECT 4460 y *A. globiformis* CECT 4500 cuando estas condiciones fueron mantenidas a estos niveles.

4. Para optimizar el proceso industrial, desde el punto de vista económico, la concentración de los nutrientes suministrados al medio de cultivo fue reducida significativamente (entre 1/2 y 1/100) en comparación con la standard utilizada en los ensayos de laboratorio.

5. Para la dilución de las aguas residuales procedentes de la síntesis de DNEG, antes de su tratamiento en la propia fábrica, se utilizaron aguas subterráneas en lugar de agua desionizada. Esto representó una disminución en el coste del proceso de 1 a 2 ordenes de magnitud con respecto al coste de los ensayos standard realizados en el laboratorio.

6. Dado que las bacterias recuperadas en los efluentes tratados en sistemas continuos conservan todas sus propiedades, con respecto a la tolerancia a nitrato y la eliminación del mismo, el funcionamiento del proceso en continuo se predice satisfactorio por largos periodos de tiempo con ambas cepas.

7. *K. oxytoca* CECT 4460 es capaz de eliminar eficazmente nitrato sin acumulación de nitrito en quimiostatos utilizando como fuente de carbono glicerol y/o sacarosa

8. El comportamiento de *K. oxytoca* CECT 4460, cultivada con mezclas de sacarosa y glicerol como fuentes de carbono, con respecto a la utilización de estos substratos, es

diferente en cultivos estancos y continuos. En el primer caso, ocurre un consumo secuencial con la utilización preferente de sacarosa sobre glicerol, mientras que en el segundo caso ocurre un consumo simultáneo de ambas fuentes de carbono.

9. La determinación de la zona de doble limitación de nutrientes para C y N ha supuesto el conocimiento del intervalo óptimo a utilizar, tanto de la razón C/N, como de la tasa de dilución (D), para la eliminación de nitrato por *K. oxytoca* CECT 4460; de este modo, a tasas de dilución de entre 0,1 h⁻¹ y 0,2 h⁻¹, y utilizando una razón C/N de entre 8 y 10, tanto el nitrato como la fuente de carbono suministrada al medio de cultivo son eliminados totalmente sin la acumulación de metabolitos en el efluente tratado.

10. La mejora genética de *K. oxytoca* CECT 4460 mediante la introducción del plásmido pUPE2 portando el gen *nasB* de *K. pneumoniae*, resulta en una disminución en la acumulación de nitrito, en cultivos estancos con sacarosa como única fuente de carbono, del 80 al 90% con respecto a la cepa silvestre. No obstante, este plásmido no se mantiene de forma estable en *K. oxytoca* CECT 4460 sin la presencia de presión selectiva.

11. La mejora genética de *K. oxytoca* CECT 4460 mediante la introducción del gen *nasB* de *K. pneumoniae* en el cromosoma, resulta en una disminución en la acumulación de nitrito, en cultivos estancos con sacarosa como única fuente de carbono, del 25% con respecto a la cepa silvestre. La copia extra del gen *nasB* se mantiene de forma estable en el cromosoma de *K. oxytoca* CECT 4460 sin la presencia de presión selectiva.

BIBLIOGRAFIA



- Abeliovitch, A.** 1993. Transformations of ammonia and the environmental impact of nitrifying bacteria. *Biodegradation* **3**:255-264.
- Abril, M.A., C. Michán, K. N. Timmis, y J. L. Ramos.** 1989. Regulator and enzyme specificities of the TOL plasmid-encoded upper pathway for degradation of aromatic hydrocarbons and expansion of the substrate range of the pathway. *J. Bacteriol.* **171**:6782-6790.
- Almeida, J. S. , M. A. M. Reis, y M. J. T. Carrondo.** 1995b. Competition between nitrate and nitrite reduction in denitrification by *Pseudomonas fluorescens*. *Biotech. Bioeng.* **46**:476-484.
- Almeida, J. S. , S. M. Júlio, M. A. M. Reis, y M. J. T. Carrondo.** 1995a. Nitrite inhibition of denitrification by *Pseudomonas fluorescens*. *Biotech. Bioeng.* **46**:194-201.
- Andersson, B. , H. Asprengen, D. S. Parker, y M. P. Lutz.** 1994. High rate nitrifying trickling filters. *Wat. Sci. Technol.* **29**:47-52.
- Araki, H.** 1990. Intermittent aeration for nitrogen removal in small aeration ditches. *Wat. Sci. Technol.* **22**:131-138.
- Babel, W.** 1982. Energetische und biochemische aspekte der mischsubstrat-fermentation, p. 183-188. In M. Ringfeil (ed.), *Abhandlungen der Akademie der Wissenschaften der DDR (N2). Biotechnologie*, Akademie Verlag, Berlin.
- Bally, M.** 1994. Physiology and ecology of nitriloacetate degrading bacteria in pure culture, activated sludge and surface waters, Ph-D ETH. Nr. 10821, Zürich, Switzerland.
- Baumann, B. , M. Snozzi, A. J. B. Zehnder, y J. R. van Der Meer.** 1996. Dynamics of denitrification activity of *Paracoccus denitrificans* in continuous culture during aerobic-anaerobic changes. *J. Bacteriol.* **178**:4367-4374.
- Baumann, B. , M. Snozzi, J. R. van Der Meer, y A. J. B. Zehnder.** 1997. Development of stable denitrifying cultures during repeated aerobic-anaerobic transient periods. *Water Res.* **8**:1947-1954.
- Baumgartner, M. , F. Samelunck, E. Bock, y R. Conrad.** 1991. Production of nitric oxide by ammonium-oxidizing bacteria colonizing building stone. *FEMS Microbial Ecology* **85**:95-100.

Beccari, M. , R. Passino, R. Ramadori, y R. Vismara. 1993. Rimozione di azoto e fosforo dai liquami, Ulrico Hoepli, Milan, Italia.

Beccari, M. , R. Passino, R. Ramadori, y V. Tandoi. 1983. Kinetics of dissimilatory nitrate and nitrite reduction in suspended growth culture. J. Water Pollut. Control Fed **55**:58-69.

Bender, R. A. y B. Friedrich. 1990. Regulation of assimilatory nitrate reductase formation in *Klebsiella aerogenes* W70. J. Bacteriol. **172**:7256-7259.

Bernet, N. , F. Habouzit, y R. Moletta. 1996. Use of an industrial effluent as a carbon source for denitrification of a high-strength wastewater. Appl. Microbiol. Biotechnol. **46**:92-97.

Bertanza, G. 1997. Simultaneous nitrification-denitrification process in extended aeration plants: pilot and real scale experiences. Wat. Sci. Technol. **35**:53-61.

Betlach, M. R. y J. M. Tiedje. 1981. Kinetic explanation for accumulation of nitrite, nitric oxide, and nitrous oxide during bacterial denitrification. Appl. Environ. Microbiol. **42**:1074-1084.

Bishop, P. L. y N. E. Kinner. 1986. Aerobic fixed-film processes, Biotechnology. Vol. 8, VCH, Weinheim, Germany.

Blaszczyk, M. 1992. Comparison of denitrification by *Paracoccus denitrificans*, *Pseudomonas stutzeri* and *Pseudomonas aeruginosa*. Acta Microbiol. Polon. **41**:203-210.

Blaszczyk, M. 1993. Effect of medium composition on the denitrification of nitrate by *Paracoccus denitrificans*. Appl. Environ. Microbiol. **59**:3951-3953.

Blaszczyk, M. , E. Galka, E. Sakowicz, y R. Mycielski. 1984. Denitrification of high concentrations of nitrites and nitrates in synthetic medium with different sources of organic carbon. III. Methanol. Acta Microbiol. Polon. **34**:195-206.

Blaszczyk, M. , M. Przytocka-Jusiak, U. Kruszewska, y R. Mycielski. 1981. Denitrification of high concentrations of nitrites and nitrates in synthetic medium with different sources of organic carbon. I. Acetic acid. Acta Microbiol. Polon. **30**:49-58.

- Blatny, J. M. , T. Brautaset, H. C. Winther-Larsen, K. Haugan, y S. Valla.** 1997. Construction and use of a versatile set of broad-host-range cloning and expression vectors based on the RK2 replicon. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:370-379.
- Bock, E. , H. P. Koops, H. Harms, y B. Ahler.** 1991. The biochemistry of nitrifying organisms, Academic Press, London, UK.
- Boller, M. , W. Gujer, y G. Nyhuis.** 1990. . *Wat. Sci. Technol.* **22**:89-100.
- Brunning-Fann, C. S. y J. B. Kaneene.** 1993. The effects of nitrate, nitrite, and N-nitroso compounds on human health: a review. *Vet Human Toxicol* **35**:521-538.
- Cali, B. M. , J. L. Micca, y V. Stewart.** 1989. Genetic regulation of nitrate assimilation in *Klebsiella pneumoniae* M5al. *J. Bacteriol.* **171**:2666-2672.
- Capdeville, B. y J. L. Rols.** 1992. Introduction to biofilms in water and wastewater treatment, p. 13-20. In L. F. Melo, T. R. Bott, M. Fletcher, and B. Capdeville (ed.), *Biofilms-Science and Technology*, Nato Series, Kluwer Academic publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Carlson, C. A. y J. L. Ingraham.** 1983. Comparison of denitrification by *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Paracoccus denitrificans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**:1247-1253.
- Castignetti, D. y T. C. Hollocher.** 1984. Heterotrophic nitrification among denitrifiers. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**:620-623.
- Cislaghi, C. y P. L. Nimis.** 1997. Lichens, air pollution and lung cancer. *Natur* **387**:463-464.
- Clark, , F. E., H. C. Francke y J. W. Strohecker.** 1976. Biological denitrification of high nitrate waste solutions. *Purdue University* **30**:768-783
- Clarkson, W. W. , B. J. B. Ross, y S. Krishnamachari.** 1991. Denitrification of high-strength industrial wastewaters. *Purdue University* **45**:347-357.
- Claus, G. y H. J. Kutzner.** 1985. Physiology and kinetics of autotrophic denitrification by *Thiobacillus denitrificans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**:283-288.

Clifford, D. y X. Liu. 1993. Biological denitrification of spent regenerant brine using a sequencing batch reactor. *Water Res.* **27**:1477-1484.

Cocaign-Bousquet, M. , A. Guyonvarch, y N. D. Lindley. 1996. Growth rate-dependent modulation of carbon flux through central metabolism and the kinetic consequences for glucose-limited chemostat cultures of *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:429-436.

Cole, J. A. 1993. Controlling environmental nitrogen through microbial metabolism. *Trends in Biotechnology* **11**:368-372.

Cole, J. A. 1994. Biodegradation of inorganic nitrogen compounds, p. 487-512. In *Biochemistry of Microbial Degradation*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Coleman, K. J. , A. Cornish-Bowden, y J. A. Cole. 1978. Activation of nitrite reductase from *Escherichia coli* K12 by oxidized nicotinamide-adenine dinucleotide. *Biochem. J.* **175**:495-499.

Coleman, K. J. , A. Cornish-Bowden, y J. A. Cole. 1978. Purification and properties of nitrite reductase from *Escherichia coli* K12. *Biochem. J.* **175**:483-493.

Collins, A. G. , W. W. Clarkson, y H. Vrona. 1988. . *J. Water Pollut. Control Fed* **60**:499.

Cooney, C. , D. I. C. Wang, y R. I. Mateles. 1976. Growth of *Enterobacter aerogenes* in a chemostat with double nutrient limitation. *Appl. Environ. Microbiol.* **31**:91-98.

Cooper, P. F. y S. C. Williams. 1990. . *Wat. Sci. Technol.* **22**:431.

Council of the European Communities. Official Journal. 1991. EC urban wastewater treatment directive nr. **91/271, 135/140**

Crutzen, P. J. 1970. The influence of nitrogen oxides on atmospheric ozone content. *Q. J. R. Meteorol. Soc.* **96**:320-325.

- Crutzen, P. J.** 1976. Upper limits on atmospheric ozone reductions following increased application of fixed nitrogen to the soil. *Geophys. Res. Lett.* **3**:169-172.
- Crutzen, P. J. y M. O. Andreae.** 1990. Biomass burning in the tropics; impact on atmospheric chemistry and biogeochemical cycles. *Science* **250**:1669-1678.
- Cuypers, H. y W. G. Zumft.** 1992. Regulatory components of the denitrification gene cluster of *Pseudomonas stutzeri*. , p. 188-196. In E. Galli, S. Silver, and B. Witholt (ed.), *Pseudomonas*.
- Chen, Hai-Lin.** 1990. Biological denitrification of primary explosives strength nitrate wastes, p. 1-14. In , Taiwan, Republic of China.
- Chiang, R. C. ; R. Cavicchioli, y R. P. Gunsalus.** 1992. Identification and characterization of narQ, a second nitrate sensor for nitrate-dependent gene regulation in *Escherichia coli*. . *Mol. Microbiol.* **6**:1913-1923.
- Chongrak, P. y H. S. Park.** 1986. . *Water Res.* **20**:1015-1021.
- Christensen, M. K. y P. Harremoës.** 1978. Nitrification and denitrification in wastewater treatment, p. 391-414. In R. Mitchell(ed.), *Water pollution microbiology*. vol. 2, John Wiley & sons, New York.
- Darwin, A. , H. Hussain, L. Griffiths, J. Grove, Y. Sambongi, S. Busby, y J. Cole.** 1993. Regulation and sequence of the structural gene for cytochrome c552 from *Escherichia coli*: not a hexahaem but a 50 kDa tetrahaem nitrite reductase. *Mol. Microbiol.* **9**:1255-1265.
- Darwin, A. , P. Tormay, L. Page, L. Griffiths, y J. Cole.** 1993. Identification of the formate dehydrogenases and genetic determinants of formate-dependent nitrite reduction by *Escherichia coli* K12. *J. Gen. Microbiol.* **139**:1829-1840.
- Darwin, A. J. y V. Stewart.** 1995. Expression of the narX, narL, narP, and narQ genes of *Escherichia coli* K-12: regulation of the regulators. *J. Bacteriol.* **177**:3865-3869.
- de Lorenzo, V. y K. N. Timmis.** 1994. Analysis and construction od stable phenotypes in gram-negative bacteria with Tn5- and Tn10-derived minitransposons, p. 386-405. In *Methods in enzymology*, Vol. 235, Academic Press, Inc. ,

de Lorenzo, V. , M. Herrero, U. Jakubzik, y K. N. Timmis. 1990. Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *J. Bacteriol.* **172**:6568-6572.

Dijkhuizen, L. , B. van der Werf, y W. Harder. 1980. Metabolic regulation in *Pseudomonas oxalaticus* OX1. Diauxic growth on mixtures of oxalate and formate or acetate. *Arch. Microbiol.* **124**:261-268.

Dominguez, H. , M. Cocaign-Bousquet, y N. D. Lindley. 1997. Simultaneous consumption of glucose and fructose from sugar mixtures during batch growth of *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **47**:600-603.

Drew, R. y N. Lowe. 1989. Positive control of *Pseudomonas aeruginosa* amidase synthesis is mediated by a transcription antitermination mechanism. *J. Gen. Microbiol.* **135**:817-823.

Dubourdieu, M. y J. DeMoss. 1992. The *narJ* gene product is required for biogenesis of respiratory nitrate reductase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **174**:867-872.

Duchars, M. G. y M. M. Attwood. 1989. The influence of the carbon:nitrogen ratio of the growth medium on the cellular composition and regulation of enzyme activity in *Hiphomicrobium* sp. *J. Gen. Microbiol.* **135**:787-793.

Duetz, W. A. , S. Marqués, C. De Jong, J. L. Ramos, y J. G. Van Andel. 1994. Inducibility of the TOL catabolic pathway in *Pseudomonas putida* (pWWO) growing on succinate in continuous culture: evidence of carbon catabolite repression control. *J. Bacteriol.* **176**:2354-2361.

Eggeling, L. y H. Sahm. 1978. Derepression and partial insensitivity to carbon catabolite repression of methanol dissimilating enzymes in *Hansenula polymorpha*. *Eur. J. Appl. Microbiol.* **5**:197-202.

Egli, T. 1982. Regulation of protein synthesis in methylotrophic yeast: repression of methanol dissimilating enzymes by nitrogen limitation. *Arch. Microbiol.* **131**:95-101.

Egli, T. 1991. On multiple-nutrient-limited growth of microorganisms, with special reference to dual limitation by carbon and nitrogen substrates. *Antoine van Leeuwen.* **60**:225-234.

- Egli, T.** 1995. The ecological and physiological significance of the growth of heterotrophic microorganisms with mixtures of substrates. *Adv. Microbiol. Ecol.* **14**:305-386.
- Egli, T. y A. Fietcher.** 1981. Theoretical analysis of media used in the growth of yeasts on methanol. *J. Gen. Microbiol.* **123**:365-369.
- Egli, T. y J. R. Quayle.** 1984. Influence of the carbon:nitrogen ratio on the utilization of mixed carbon substrates by the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*, p. 13. In Proceedings of the 100th Annual Meeting of the Society for General Microbiology, Warwick.
- Egli, T. y J. R. Quayle.** 1986. Influence of the carbon:nitrogen ratio of the growth medium on the cellular composition and the ability of the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* to utilize mixed carbon sources. *J. Gen. Microbiol.* **132**:1779-1788.
- Egli, T. , C. Bosshard, y G. Hamer.** 1986. Simultaneous utilization of methanol-glucose mixtures by *Hansenula polymorpha* in chemostat: Influence of dilution rate and mixture composition on utilization pattern. *Biotech. Bioeng.* **28**:1735-1741.
- Egli, T. , T. Haltmeier, y A. Fiechter.** 1982. Regulation of the synthesis of methanol-oxidizing enzymes in *Kloeckera* sp. 2201 and *Hansenula polymorpha*, a comparison. *Arch. Microbiol.* **131**:174-175.
- Egli, T. , U. Lendenmann, y M. Snozzi.** 1993. Kinetics of microbial growth with mixtures of carbon sources. *Antoine van Leeuwen.* **63**:289-298.
- Fernández-Polanco, F. , S. Villaverde, y P. A. García.** 1994. . *Wat. Sci. Technol.* **30**:121.
- Fischer, H. M.** 1994. Genetic regulation of nitrogen fixation in Rhizobia. *Microbiol. Rev.* **58**:352-386.
- Flores, E. , M. G. Guerrero, y M. Losada.** 1983. Photosynthetic nature of nitrate uptake and reduction in the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *Biochim. Biophys. Acta* **722**:408-416.
- Fossing, H. , V. A. Gallardo, B. B. Jørgensen, M. Hüttl, L. P. Nielsen, H. Schulz, D. E. Canfield, S. Forster, R. N. Glud, J. K. Gundersen, J.**

Küver, N. B. Ramsing, A. Teske, B. Thamdrup, y O. Ulloa. 1995. Concentration and transport of nitrate by the mat-forming sulphur bacterium *Thioploca*. *Nature* **374**:713-715.

Francis, C. W. y J. B. Mankin. 1977. High nitrate denitrification in continuous flow-stirred reactors. *Water Res.* **11**:289-294.

Ganczarczyk, J. J. 1979. . *Water Res.* **13**:337-342.

Garrido, J. M. , W. A. J. van Benthum, M. C. M. van Loosdrecht, y J. J. Heijnen. 1997. Influence of dissolved oxygen concentration on nitrite accumulation in a biofilm airlift suspension reactor. *Biotech. Bioeng.* **53**:168-178.

Golden, J. W. , S. J. Robinson, y R. Haselkorn. 1985. Rearrangement of nitrogen fixation genes during heterocyst differentiation in the cyanobacterium *Anabaena*. *Nature* **314**:419-423.

Goldman, B. S. , J. T. Lin, y V. Stewart. 1994. Identification and structure of the *nasR* gene encoding a nitrate- and nitrite-responsive positive regulator of *nasFEDCBA* (nitrate assimilation) operon expression in *Klebsiella pneumoniae* M5al. *J. Bacteriol.* **176**:5077-5085.

Goronszy, C. , J. Wanner, R. Salterelli, y A. Tilche. 1996. Conference on advanced water treatment, p. 163-172. A. Proc. Aquatech'96, IAWQ,

Gottschal, J. C. 1993. Growth kinetics and competition - some contemporary comments. *Antoine van Leeuwen.* **63**:299-313.

Gräzer-Lamper, S. D. , T. Egli, y G. Hamer. 1986. Growth of *Hiphomicrobium* ZV620 in the chemostat: regulation of NH_4^+ -assimilating enzymes and cellular composition. *J. Gen. Microbiol.* **132**:3337-3347.

Guardia, M. J. , J. Eiroa, y E. García. 1996. Producción de ácido D-glutámico. Optimización del medio de cultivo, p. 259-260. In F. Fernández-Polanco, P. A. García, G. González, and M. M. Peña (ed.), *Comunicaciones del III Congreso Ibérico de Biotecnología*, Los Autores. Grupo de Biotecnología Ambiental. Universidad de Valladolid, Valladolid.

Guerrero, M. G. , J. M. Vega, y M. Losada. 1981. The assimilatory nitrate-reducing system and its regulation. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **32**:169-204.

Halling-Sorensen, B. y S. E. Jorgensen. 1993. The removal of nitrogen compounds from wastewater, p. 55-118. Elsevier, Amsterdam.

Hamer, G. , D. E. F. Harrison, J. H. Harwood, y H. H. Topiwala. 1975. SCP production from methane, p. 357-369. In S. R. Tannenbaum and D. I. Wang (ed.), *Single Cell Protein II*, MIT press,, Cambridge, Mass. .

Harborne, N. R. , L. Griffiths, S. J. W. Busby, y J. A. Cole. 1992. Transcriptional control, translational and function of the products of the five open reading frames of the *Escherichia coli* nir operon. *Mol. Microbiol.* **6**:2805-2813.

Harder, W. y L. Dijkhuizen. 1982. Strategies of mixed substrate utilization in microorganisms. *Phil. Trans. R. Soc. London series. B. Biol. Sci.* **297**:459-480.

Harrison, D. E. F. 1972. Physiological effects of dissolved oxygen tension and redox potential on growing populations of microorganisms. *J. Appl. Chem. Biotechnol.* **22**:417-440.

Heijnen, J. J. , A. Mulder, R. Weltevrede, P. H. Hols, y H. L. J. M. van Leeuwen. 1990. . *Chem. Eng. Technol.* **13**:202.

Heijnen, J. J. , M. C. M. van Loosdrecht, R. Mulder, R. Weltevrede, y A. Mulder. 1991. Large scale anaerobic-aerobic treatment of complex industrial wastewater using biofilm reactors. *Wat. Sci. Technol.* **23**:1427-1436.

Herrero, M. , V. de Lorenzo, y K. N. Timmis. 1990. Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **172**:6557-6567.

Hirose, S. , K. Takeuchi, y Y. Suzuki. 1982. In vitro characterization of the fibrio gene promoter by the use of single-base substitution mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **79**:7258-7262

Hiscock, K. M. , J. W. Lloid, y D. N. Lerner. 1991. Review of natural and artificial denitrification of groundwater. *Water Res.* **25**:1099-1111.

Huetting, S. y D. W. Tempest. 1979. Influence of the glucose input concentration on the kinetics of metabolite production by *Klebsiella aerogenes* NCTC 418: growing in chemostat culture in potassium- or ammonia-limited environments. Arch. Microbiol. **123**:189-199.

Huijberts, G. N. M. y G. Eggink. 1996. Production of poly(3-hydroxyalkanoates) by *Pseudomonas putida* KT2442 in continuous cultures. Appl. Microbiol. Biotechnol. **46**:233-239.

Hund, R. , L. Figueroa, N. Cook, K. Cutter, J. Silverstein, y J. Deters. 1993. Biological denitrification of high nitrate industrial wastewater. Purdue University **48**:723-732.

Isken, S. y J. A. M. De Bont. 1996. Active efflux of toluene in a solvent-resistant bacterium. J. Bacteriol. **178**:6056-6058.

Jeris, J. S. y R. W. Owens. 1975. . J. Water Pollut. Control Fed **47**:2043-2057.

Jeris, J. S. , R. W. Owens, y R. Hickey. 1977. . J. WATER POLLUT. CONTROL FEDS **16**:

Jones, R. , P. Woodley, y R. L. Robson. 1984. Cloning and organisation of some genes for nitrogen fixation from *Azotobater chroococcum* and their expression in *Klebsiella pneumoniae*. Mol Gen Genet **197**:318-327.

Kaiser, M. y G. Sawers. 1995. Nitrate repression of the *Escherichia coli* *pfl* operon is mediated by the dual sensors NarQ and NarX and the dual regulators NarL and NarP. J. Bacteriol. **177**:3647-3655.

Kakutani, T. , T. Bappu, y K. Arima. 1981. Regulation of nitrite reductase in the denitrifying bacterium *Alcaligenes faecalis* S-6. Agric. Biol. Chem. **45**:23-28.

Kamath, S. , D. A. Sabatini, y L. W. Canter. 1992. Treatment of high nitrogen (NaNO₂) wastewater by biological nitrification/denitrification. Purdue University **46**:623-630.

- Kaplan, D. L. , P. A. Riley, J. Pierce, y A. M. Kaplan.** 1987. Denitrification of high nitrate loads-efficiencies of alternative carbon sources. *International Biodeterioration* **23**:233-248.
- Kessler, B. , V de Lorenzo, y K. N. Timmis.** 1992. A general system to integrate *lacZ* fusions into the chromosomes of gram-negative eubacteria: regulation of the Pm promoter of the TOL plasmid studied with all controlling elements in monocopy. *Mol. Gen. Genet.* **233**:293-301.
- Klapwijk, J. C. M. , van der Hoeven, y G. Lettinga.** 1981. . *Water Res.* **15**:1-6.
- Kleiner, D.** 1979. Regulation of ammonium uptake and metabolism by nitrogen fixing bacteria. iii. *Clostridium pasterianum*. *Arch. Microbiol.* **120**:263-270.
- Knowles, R.** 1982. Denitrification. *Microbiol. Rev.* **46**:43-70.
- Krishnamachari, S. y W. W. Clarkson.** 1993. Nitrite accumulation in the effluents from high-strength denitrification of industrial wastewaters. *Purdue University* **47**:383-392.
- Kross, B. C. , G. R. Hallberg, D. R. Bruner, K. Cherryholmes, y J. K. Johnson.** 1993. The nitrate contamination of private well water in Iowa. *Am J Public Health* **83**:270-272.
- Kucera, I. , J. Laucik, y V. Dadák.** 1983. The function of cytoplasmic membrane of *Paracoccus denitrificans* in controlling the rate of reduction of terminal acceptors. *European Journal of Biochemistry. FEBS* **136**:135-140.
- Kurt, M. , I. J. Dunn, y J. R. Bourne.** 1987. . *Biotechnol. Bioeng.* **29**:493-501.
- Lawson, C. T.** 1981. Development of a biological denitrification process for a high-strength industrial waste. *Purdue University* **35**:882-888.
- Lazarova, V. Z. , B. Capdeville, y L. Nikolov.** 1992. . *Wat. Sci. Technol.* **26**:555-566.
- Lemmer, H. , A. Zaglauer, y G. Metzner.** 1997. Denitrification in a methanol-fed fixed-bed reactor. Part 1: physico-chemical and biological characterization. *Water Res.* **31**:1897-1902.

Lendenmann, U. , M. Snozzi, y T. Egli. 1996. Kinetics of the simultaneous utilization of sugar mixtures by *Escherichia coli* in continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:1493-1499.

Levy, 1992

Lewandowski, G. A. y B. C. Baltzis. 1992. Analysis of sequencing batch bioreactors in large-scale denitrifying applications. *Chem. Eng. Sci.* **47**:2389-2394.

Lin, J. T. y V. Stewart. 1996. Nitrate and nitrite-mediated transcription antitermination control of *nasF* (nitrate assimilation) operon expression in *Klebsiella pneumoniae* M5al. *J. Mol. Biol.* **256**:423-435.

Lin, J. T. , B. S. Goldman, y V. Stewart. 1993. Structures of genes *nasA* and *nasB*, encoding assimilatory nitrate and nitrite reductases in *Klebsiella pneumoniae* M5al. *J. Bacteriol.* **175**:2370-2378.

Lin, J. T. , B. S. Goldman, y V. Stewart. 1994. The *nasFEDCBA* operon for nitrate and nitrite assimilation in *Klebsiella pneumoniae* M5al. *J. Bacteriol.* **176**:2551-2559.

Liu, S. C. , R. J. Cicerone, T. M. Donahue, y W. L. Chameides. 1977. Sources and sinks of atmospheric N₂O and the possible ozone reduction due to industrial fixed nitrogen fertilizers. *Tellus* **29**:251-263.

Lowe, N. , P. M. Rice, y R. Drew. 1989. Nucleotide sequence of the aliphatic amidase regulator gene (*amiR*) of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Lett* **246**:39-43.

Macaskie, L. E. , P. Yong, T. C. Doyle, M. G. Roig, M. Diaz, y T. Manzano. 1997. Bioremediation of uranium-bearing wastewater: biochemical and chemical factors influencing bioprocess application. *Biotech. Bioeng.* **53**:100-109.

Magasanik, B. y F. C. Neidhardt. 1987. Regulation of carbon and nitrogen utilization. xx

Maniatis, T. , E. F. Fritsch, y J. Sambrook. 1982. *Molecular cloning: A laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Manzano, C. , P. Candau, C. Gomez-Moreno, A. M. Relimpio, y M. Losada. 1976. Ferredoxin-dependent photosynthetic reduction of nitrate and nitrite by particles of *Anacystis nidulans*. *Mol & Cell. Biochem.* **10**:161-169.

Martins dos Santos, V. A. P. , J. Tramper, y R. H. Wijffels. 1992. Integrated nitrification and denitrification with immobilized bacteria, p. 449-453. In L. F. Melo, T. R. Bott, M. Fletcher, and B. Capdeville (ed.), *Biofilms-Science and Technology*, Nato Series,

Martins dos Santos, V. A. P. , J. Tramper, y R. H. Wijffels. 1993. Simultaneous nitrification and denitrification using immobilized microorganisms. *Biomat. Artif. Cells & Inmob. Biotechnol.* **21**:317-322.

Martins dos Santos, V. A. P. , J. Tramper, y R. H. Wijffels. 1996. The magic bead concept: an integrated approach for nitrogen removal with co-immobilized microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **45**:447-453.

Martins dos Santos, V. A. P. , L. Marchal, J. Tramper, y R. H. Wijffels. 1996. Modelling and evaluation of an integrated nitrogen removal system with co-immobilized microorganisms. *Biotechnol. Prog.* **12**:163-171.

Mateju, V. , S. Cizinska, J. Krejci, y T. Janoch. 1992. Biological water denitrification: a review. *Enzyme Microbial Technology* **14**:170-183.

Mateles, R. I. , S. K. Chian, y R. Silver. 1967. Continuous culture on mixed substrates, p. 232-239. In P. O. Powell, C. G. T. Evans, R. E. Starng, and D. W. Tempest (ed.), *Microb. Physiol. Cont. Culture (Proc. 3rd Int. Symp.)*, H. M. S. O. , London.

McElroy, M. B. , S. C. Wofsy, y Y. L. Yung. 1977. Nitrogen cycle perturbations due to man and their impact on atmospheric N₂O and O₃. *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B* **277**:159-181.

Meijer, E. M. , J. W. van der Zwaan, R. Wever, y A. H. Stouthamer. 1979. Anaerobic respiration and energy conservation in *Paracoccus denitrificans*. Functioning of iron-sulfur centers and the uncoupling effect of nitrite. *European Journal of Biochemistry.* **FEBS** **96**:69-76.

Merrick, M. 1992. Regulation of nitrogen fixation in free-living and symbiotic bacteria, p. 835-876. In G. Stacey, R. Burris, and H. Evans (ed.), Biological nitrogen fixation, Chapman & Hall, New York.

Merrick, M. J. y R. A. Edwards. 1995. Nitrogen control in bacteria. *Microbiol. Rev.* **59**:604-622.

Minkevich, I. G. , A. Y. Krynitskaya, y V. K. Eroshin. 1988. A double substrate limitation zone of continuous microbial growth, p. 171-189. In P. Kyslik, E. A. Dawes, V. Krumphanzl, and M. Novak (ed.), Continuous Culture, Academic Press, London.

Miyaji, Y. y K. Kato. 1975. Biological treatment of industrial wastes water by using nitrate as an oxygen source. *Water Res.* **9**:95-101.

Moore, S. F. y E. D. Schroeder. 1971. The effect of nitrate feed rate on denitrification. *Water Res.* **5**:445-452.

Mulburguer, M. C. 1971. . *J. WATER POLLUT. CONTROL FED* **43**:2059-2070.

Mycielski, R. , M. Blaszczyk, A. Jackowska, y H. Olkowska. 1983. Denitrification of high concentrations of nitrites and nitrates in synthetic medium with different sources of organic carbon. II. Ethanol. *Acta Microbiol. Polon.* **32**:381-388.

Nakano, M. M. , F. Yang, P. Hardin, y P. Zuber. 1995. Nitrogen regulation of *nasA* and the *nasB* operon, which encode genes required for nitrate assimilation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **177**:573-579.

Narkis, N. , M. Rebhun, y Ch. Sheindorf. 1979. Denitrification at various carbon to nitrogen ratios. *Water Res.* **13**:93-98.

Neubauer, H. y F. Götz. 1996. Physiology and interaction of nitrate and nitrite reduction in *Staphylococcus carnosus*. *J. Bacteriol.* **178**:2005-2009.

Nordeidet, B. , B. Ruston, y H. Ødegaard. 1994. . *Wat. Sci. Technol.* **29**:77.

North, A. K. , K. E. Klose, K. M. Stedman, y S. kustu. 1993. Prokaryotic enhancer-binding proteins reflect eukaryote-like modularity: the puzzle of nitrogen regulatory protein C. *J. Bacteriol.* **175**:4267-4273.

- Nurse, G. R.** 1980. Denitrification with methanol: microbiology and biochemistry. *Water Res.* **14**:531-537.
- O'leary, V. y M. Solberg.** 1976. A effect of sodium nitrite inhibition on intracellular thiol groups and on the activity of certain glycolytic enzymes in *Clostridium perfringens*. . *Appl. Environ. Microbiol.* **31**:208-212.
- Ogawa, K-I. , E. Akagawa, K. Yamane, Z-W. Sun, M. LaCelle, P. Zuber, y M. M. Nakano.** 1995. The nasB operon and nasA gene are required for nitrate/nitrite assimilation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **177**:1409-1413.
- Omata, T. , X. Andriesse, y A. Hirano.** 1993. Identification and characterization of a gene cluster involved in nitrate transport in the cyanobacterium *Synechococcus* PCC7942. *Mol Gen Genet* **236**:193-202.
- Page, , L. Griffiths, y J. A. Cole.** 1990. Different physiological roles of two independent pathways for nitrite reduction to ammonia by enteric bacteria. *Microbiol.* **154**:349-354.
- Pitt, W. W. , C. W. Hancher, y B. D. Patton.** 1981. Biological reduction of nitrates in wastewaters from nuclear processing using a fluidized-bed bioreactor. *Nuclear and Chemical Waste Management* **2**:57-70.
- Pope, N. R. y J. A. Cole.** 1982. Generation of a membrane potential by one of two independent pathways for nitrite reduction by *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* **128**:219-222.
- Puckett, L. J.** 1995. Identifying the major sources of nutrient water pollution. *Environ. Sci. Technol.* 408-412.
- Rai, A. K. , A. K. Kashyap, y S. L. Gupta.** 1981. ATP-dependent uptake of nitrate in *Nostoc muscorum* and inhibition by ammonium ions. *Biochim. Biophys. Acta* **674**:78-86.
- Rake, J. B. y R. G. Eagon.** 1980. Inhibition, but not uncoupling, of respiratory energy coupling of three bacterial species by nitrite. *J. Bacteriol.* **144**:975-982.

- Ramakrishna, R. y D. Ramkrishna.** 1996. Cybernetic modeling of growth in mixed, substitutable substrate environments: preferential and simultaneous utilization. *Biotech. Bioeng.* **52**:141-151.
- Ramos, J. L. y R. L. Robson.** 1985. Lesion in citrate synthase that affect aerobic nitrogen fixation by *Azotobacter chroococcum*. *J. Bacteriol.* **162**:746-751.
- Ramos, J. L. , A. Haïdour, E. Duque, G. Piñar, V. Calvo, y J. M. Oliva.** 1996. Metabolism of nitrate esters by a consortium of two bacteria. *Nature Biotech.* **14**:320-322.
- Ramos, J. L. , M. G. Guerrero, y M. Losada.** 1982. Optimization of conditions for ammonia photoproduction from nitrate by *Anacystis nidulans* cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**:1013-1019.
- Rasmussen, R. A. y M. A. K. Khalil.** 1986. Atmospheric trace gases: trends and distribution over the last decade. *Science* **232**:1623-1624.
- Rhee, G. Y. y G. W. Fuhs.** 1978. Wastewater denitrification with one-carbon compounds as energy source. *J. Water Pollut. Control Fed* **59**:2111-2119.
- Rittmann, B. y W. E. Langeland.** 1985. Simultaneous nitrification and denitrification in single channel oxidation ditches. *J. Water Pollut. Control Fed* **57**:4-16.
- Robertson, L. A. y J. G. Kuenen.** 1992. Nitrogen removal from water and waste, R. Herbert, C. Jone, and I. Watson-Craik (ed.), *Microbial control of pollution*, Society for General Microbiology. Cambridge University Press, Cambridge.
- Robertson, L. A. , E. W. J. van Niel, R. A. M. Torremans, y J. G. Kuenen.** 1988. Simultaneous nitrification and denitrification in aerobic chemostat cultures of *Thiosphaera pantotropha*. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:2812-2818.
- Rodríguez-Herva, J. J. , M. I. Ramos-González, y J. L. Ramos.** 1996. The *Pseudomonas putida* peptidoglycan-associated outer membrane lipoprotein is involved in maintenance of the integrity of the cell envelope. *J. Bacteriol.* **178**:1699-1706.
- Rutgers, M. , P. A. Balk, y K. Van Dam.** 1990. Quantification of multiple-substrate controlled growth. Simultaneous ammonium and glucose limitation in chemostat cultures of *Klebsiella pneumoniae*. *Arch. Microbiol.* **153**:478-484.

- Sahm, H. y F. Wagner.** 1973. Microbial assimilation of methanol. The ethanol- and methanol-oxidizing enzymes of the yeast *Candida boidinii*. European Journal of Biochemistry. FEBS **36**:250-256.
- Sakai, Y. , T. Miama, y F. Takahashi.** 1997. Simultaneous removal of organic and nitrogen compounds in intermittently aerated activated sludge process using magnetic separation. Water Res. **31**:2113-2116.
- Sayre, I. M. J.** 1988. . J. Am. Water Works Ass. **80**:53-60.
- Schmidt, S. K. y M. Alexander.** 1985. Effects of dissolved organic carbon and second substrates on the biodegradation of organic compounds at low concentrations. Appl. Environ. Microbiol. **49**:822-827.
- Schröder, I. , C. D. Wolin, R. Cavicchioli, y R. P. Gunsalus.** 1994. Phosphorylation and dephosphorylation of the NarQ, NarX, and NarL proteins of the nitrate-dependent two-component regulatory system of *Escherichia coli*. . J. Bacteriol. **176**:4985-4992.
- Schröder, I. , S. Darie, y R. P. Gunsalus.** 1992. Activation of the *Escherichia coli* nitrate reductase (narGHJI) operon by NarL and Fnr requires integration host factor. J. Biol. Chem. **268**:771-774.
- Sedlak, R. I.** 1991. Phosphorous and nitrogen removal from municipal wastewater: principle and practice, p. 3-29. Lewis Publishers, New York.
- Senn, H.** 1989. Kinetik und Regulation des Zuckerabbaus von *Escherichia coli* ML30 bei tiefen Zuckerkonzentrationen, Ph-D Thesis, ETH Nr. 8831, Zürich.
- Shade, H. J.** 1977. . Chem Eng Progr **73**:45-50.
- Sheng-Kun, C. , J. Chin-Kun, y C. Sheng-Shung.** 1991. Nitrification and denitrification of high strength ammonium and nitrite wastewater with biofilm reactors. Wat. Sci. Technol. **23**:1417-1425.

- Sijbesma, W. F. H. , J. S. Almeida, M. A. M. Reis, y H. Santos.** 1996. Uncoupling effect of nitrite during denitrification by *Pseudomonas fluorescens*: an in vivo ^{31}P -NMR study. *Biotech. Bioeng.* **52**:176-182.
- Sikora, L. J. y D. R. Keeney.** 1976. Evaluation of a sulfur-*Thiobacillus denitrificans* nitrate removal system. *J. Environ. Qual.* **5**:298-303.
- Silver, R. y R. I. Mateles.** 1969. Control of mixed-substrate utilization in continuous culture of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **97**:535-543.
- Smith, J. M. , A. N. Masse, W. A. Feige, y L. J. Kamphake.** 1972. Nitrogen removal from municipal waste water by columnar denitrification. *Environ. Sci. Technol.* **6**:260-267.
- Smith, R. L. , M. L. Ceazan, y M. H. Brooks.** 1994. Autotrophic, hydrogen-oxidizing, denitrifying bacteria in groundwater, potential agents for bioremediation of nitrate contamination. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:1949-1955.
- Stanier, R. Y. , J. L. Ingraham, M. L. Wheelis, y P. R. Painter.** 1991. *Microbiología*, p. 588-591. Editorial Reverté, S. A. , Barcelona.
- Stewart, V.** 1988. Nitrate respiration in relation to facultative metabolism in Enterobacteria. *Microbiol. Rev.* **52**:190-232.
- Stewart, V.** 1993. Nitrate regulation of anaerobic respiratory gene expression in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **9**:425-434.
- Stewart, V.** 1994. Regulation of nitrate and nitrite reductase synthesis in enterobacteria. *Antoine van Leeuwen.* **66**:37-45.
- Stewart, V. y B. M. Cali.** 1990. Genetic evidence that NarL function is not required for nitrate regulation of nitrate assimilation in *Klebsiella pneumoniae* M5al. *J. Bacteriol.* **172**:4482-4488.
- Szpyrkowicz, L. , S. Rigoni-Stern, y F. Zilio Grandi.** 1991. . *Water Res.* **25**:1351-1356.

Tanaka, H. y I. J. Dunn. 1982. Kinetics of biofilm nitrification. *Biotechnol. Bioeng.* **24**:669-689.

Tanaka, K. , y H. Emori. 1993. Development of biological nutrient control in Japan. The 2nd Japan-The Netherlands Workshop on Integrated Water Quality Management.

Thayer, J. R. y R. C. Huffaker. 1982. Kinetic evaluation, using ^{13}N , reveals two assimilatory nitrate transport system in *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **149**:198-202.

Tijhuis, L. 1994. The biofilm airlift suspension reactor: biofilm formation, detachment and heterogeneity, PhD thesis. Delft University of Technology, Delft, The Netherlands.

Tijhuis, L. , J. L. Huisman, H. D. Hekkelman, M. C. M. van Loosdrecht, y J. J. Heijnen. 1995. Formation of nitrifying biofilms on small suspended particles in airlift reactors. *Biotechnol. Bioeng.* **47**:585-595.

Tilche, A. , G. Bortone, G. Forner, M. Indulti, L. Stante, y O. Tesini. 1994. Proceedings of Seventh International Symposium on Anaerobic Digestion, p. 708-717. Ciudad del Cabo, Sudáfrica.

Tramper, J. 1984. Nitrification nad denitrification by immobilized bacteria, p. 363-368. In Proc. 3th European Congress on Biotechnology, VCH, Vol IV,

Tramper, J. 1987. Nitrification and denitrification by immobilized viable cells, p. 362-3666. In L. Laskin, D. Mosbach, and L. B. Thomas (ed.), *Enzyme engineering 8*, 8th ed. Wingard Annuals of the New York Academy of Sciences,

Van Verseveld, H. W. , J. P. Boon, y A. H. Stouthamer. 1979. Growth yields and teh efficiency of oxydative phosphorylation of *Paracoccus denitrificans* during two (carbon)substrate-limited growth. *Arch. Microbiol.* **121**:213-223.

van der Geest, A. y W. Witvoet. 1985. Nitrification and denitrification in carrousel systems. , Specialized conference on nitrogen as water pollutant, IAWPR, Copenhagen, Denmark.

van der Hock, J. P. , P. J. M. Latour, y A. Klapwijk. 1987. Denitrification with methanol in the presence of high salt concentrations and at high pH. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**:199-205.

van der Hock, J. P. , P. J. M. van der Ven, y A. Klapwijk. 1988. Combined ion exchange/biological denitrification process for nitrate removal from ground water under different process conditions. *Water Res.* **22**:679-684.

van Loosdrecht, M. C. M y J. J. Heijnen. 1993. Bioreactors for wastewater treatment. *Trends in Biotechnol* **11**:117-121.

van Loosdrecht, M. C. M. y J. J. Heijnen. 1996. Biofilm processes, p. 255-271. In R. G. Willaert, G. V. Baron, and L. de Backer (ed.), *Inmovilized living cell systems*, John Wiley & sons, New York, USA.

Walker, J. F. Jr. , M. V. Helfrich, y T. L. Donaldson. 1989. Biodenitrification of uranium refinery wastewaters. *Environ. Progress* **8**:97-101.

Wang, W. C. , Y. L. Yung, A. A. Lacis, T. Mo, y J. E. Hansen. 1976. Greenhouse effects due to man-made perturbations of trace gases. *Science* **194**:685-690.

Wanner, U y T. Egli. 1990. Dynamics of microbial growth and cell composition in batch culture. *FEMS Microbiol. Rev.* **75**:19-44.

Wiesmann, U. 1994. Biological nitrogen removal from wastewaters, p. 113-154. In A. Fletcher (ed.), *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology*, Springer-Verlag, Berlin.

Wijffels, R. H. y J. Tramper. 1995. Nitrification by immobilized cells. *Enz. Microb. Biotechnol.* **17**:482-492.

Wilderer, P. A. , W. L. Jones, y U. Dau. 1987. Competition in denitrification systems affecting reduction rate and accumulation of nitrite. *Water Res.* **21**:239-245.

Williams, S. C. , D. W. Harrington, y P. F. Cooper. 1986. . *WPCF* **85**:81-89.

Yanisch-Perron, C. , J. Viera, y J. Messing. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene.* **33**:103-109

Yarbrough, J. M. , J. B. Rake, y R. G. Eagon. 1980. Bacterial inhibitory effects of nitrite: inhibition of active transport, but not of group translocation, and of intracellular enzymes. *Appl. Environ. Microbiol.* **39**:831-834.

Yee, L. y H. W. Blanch. 1993. Defined media optimization for growth recombinant *Escherichia coli* X 90. *Biotech. Bioeng.* **41**:221-230.

Zevenboom, W. , M. Rademaker, y F. Colijn. 1990. Exceptional algal blooms in Dutch sea waters: North Sea pollution and technical strategies for improvement, p. 473-486. In IAWPRC/EWPACA/NVA, Amsterdam, The Netherlands.

Zumft, W. G. 1992. The denitrifying prokaryotes, p. 554-582. In A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, and K-H. Schleifer (ed.), *The Prokaryotes*.