

## **EVOLUCIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LOS MICROORGANISMOS EN LOS PROCESOS DE ACLIMATACIÓN Y DESACLIMATACIÓN AL 4-CLOROFENOL**

Iván Moreno-Andrade y Germán Buitrón\*

Coordinación de Bioprocesos Ambientales, Instituto de Ingeniería, UNAM.  
Apartado Postal 70-472, 04510 México D.F., México.

\* Email: [gbm@pumas.iingen.unam.mx](mailto:gbm@pumas.iingen.unam.mx)

### **RESUMEN**

En el presente trabajo se describe la evolución de las curvas cinéticas y de actividad respiratoria de un cultivo mixto de microorganismos durante los procesos de aclimatación y desaclimatación (ayuno) durante la degradación del 4-clorofenol (4CF) en un biorreactor aerobio discontinuo. Los resultados muestran una reducción en el tiempo de degradación cuando el proceso de aclimatación se lleva a cabo. Cuando la aclimatación fue concluida, se encontró que existe una afinidad del consorcio de microorganismos a biodegradar el tóxico se incremento, mientras que la capacidad de biodegradar acetato disminuyó. Los ayunos generaron un decremento en la actividad de los microorganismos, se observó una disminución en la tasa de remoción de 20 a 44 %, además de una pérdida de actividad (medida como tasa específica de consumo de oxígeno) de 26 a 35%. El grado de desaclimatación de los microorganismos en ayuno parece ser afectado por la historia de la comunidad.

**Palabras clave:** actividad; aclimatación, desaclimatación, SBR, 4-clorofenol.

### **INTRODUCCION**

En las industrias químicas, farmacéuticas, plásticas, y petroquímicas, para algunos casos, los procesos de producción son realizados de forma discontinua. Se ha observado que los procesos de tratamiento de aguas residuales industriales no obtienen eficiencias satisfactorias debido a las altas variaciones en flujo y concentración de contaminantes tóxicos en las aguas de desecho. Además, debido a su toxicidad, es difícil el tratamiento biológico de desechos industriales que contienen una alta concentración de fenoles. El primer paso para biodegradar sustancias tóxicas en una planta de tratamiento de aguas residuales es la aclimatación de los microorganismos. Cuando los microorganismos se ponen en contacto con compuestos tóxicos, en un ambiente favorable, la aclimatación a estos compuestos puede ocurrir (Aelion *et al.*, 1989). Diversos fenómenos se han propuesto para explicar la fase de la aclimatación. Wiggings *et al.* (1987) sugirieron que existe una selección y multiplicación de microorganismos especializados durante esta fase, además pueden existir transformaciones fisiológicas en el sistema metabólico de los microorganismos, es decir, alteraciones a nivel regulación y producción enzimática, mutaciones, etc. En comunidades microbianas aerobias, los períodos de aclimatación pueden variar entre varias horas a varios días dependiendo de las características del agua residual (Wiggings *et al.* 1987) y de las características iniciales del inóculo (Moreno y Buitrón, 2004). Sin embargo, poca

información está disponible acerca de la evolución de la actividad de un consorcio microbiano durante la aclimatación a las aguas residuales tóxicas.

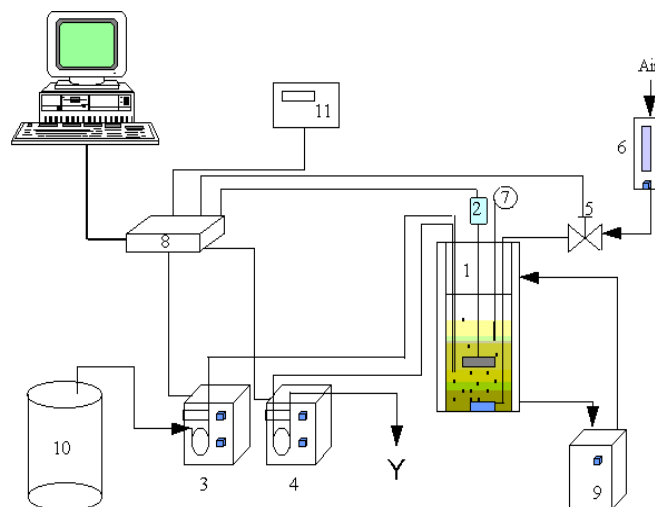
Por otra parte, se ha demostrado que la aclimatación no es permanente (Buitrón y Moreno, 2004). La exposición de la comunidad aclimatada a períodos prolongados del sustrato (ayuno) produce una disminución de la actividad e incluso la muerte de algunos de ellos (Coello *et al.*, 2003). Buitrón *et al.* (1994), encontraron un efecto negativo en la actividad de microorganismos de lodos activados debido a la exposición de ayunos al 4CF en un SBR, en ese estudio la aireación se extendió entre 20 y 23 horas después de la degradación completa del tóxico, encontrando que el tiempo de degradación se incrementó 6 veces (de 0.7 a 4.5 h) como resultado del ayuno. Esta pérdida en la capacidad de degradación de los microorganismos fue atribuida a una disminución de la actividad enzimática y la viabilidad de las células en suspensión. Aunque esta pérdida de actividad debido al ayuno ha sido reportada, esta variable no ha sido tomada en cuenta en la operación de las plantas de tratamiento de aguas residuales industriales.

La comprensión de los fenómenos anteriores (aclimatación y desaclimatación) es de gran importancia para tener un mejor control de las plantas de tratamiento. En el presente trabajo se describe la evolución de las curvas cinéticas y de actividad respiratoria de un cultivo mixto de microorganismos durante los procesos de aclimatación y desaclimatación (ayuno) durante la degradación del 4-clorofenol en un biorreactor aerobio discontinuo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se empleó un reactor aerobio discontinuo secuencial (SBR) con una capacidad de 7L con un volumen de intercambio de 57% (figura 1). La tasa de flujo de aire empleada fue de 1.5 litros por minuto y una temperatura controlada de 20°C dentro del reactor. El biorreactor fue inoculado con microorganismos provenientes de una planta de tratamiento de aguas residuales municipales. Se empleó un agua sintética que contenía 4CF como única fuente de carbono y energía. Se agregaron nutrientes como nitrógeno, fósforo y oligoelementos siguiendo la técnica recomendada por AFNOR (1985). El SBR fue operado bajo la siguiente estrategia de control: preaeración (15 min) llenado (5 min), reacción (variable dependiendo del tiempo necesario para conseguir una eficiencia de remoción de 4CF de 99%), sedimentación (12 a 30 min). El tiempo de degradación fue seguido por medio de la medición de la concentración del oxígeno disuelto presente en el reactor (Buitrón *et al.*, 2003).

La concentración de sustrato fue medida por medio de muestreo y su posterior procesamiento fuera de línea por medio de la técnica calorimétrica de la 4-aminoantipirina (Standard Methods, 1992). Los sólidos suspendidos volátiles y totales (SSV y SST) se determinaron de acuerdo a Standard Methods (1992). El carbono orgánico disuelto (COD) fue determinado por medio del sistema Shimadzu TOC-5050 y la demanda química de oxígeno (DQO) de acuerdo a Standard Methods (1992). Estos análisis se llevaron a cabo con el fin de evaluar la mineralización del 4CF. El metabolito (ácido semialdehído 5-cloro-2hidroxi- mucónico), el cual es formado por una ruta de degradación alternativa por los microorganismos, y que es inhibitoria para ellos mismos, fue determinada por medio de espectrofotometría a 380 nm usando un espectrofotómetro HACH.



**Figura 1.** Sistema experimental empleado. Reactor (1), agitador (2), bomba de llenado (3), bomba de vaciado (4), controlador de flujo másico (5), flujómetro (6), termómetro (7), interfase (8), calentador(9), tanque de almacenamiento (10), oxímetro (11)

Con el fin de conocer la evolución de la actividad respirométrica, la tasa específica de consumo de oxígeno (TECO) fue medida por medio de un mini reactor de 160 mL al cual se le agregaron 10 mL de los microorganismos del SBR, estos se tomaron justo después de que la degradación llegara a su fin. Una solución saturada de oxígeno con nutrientes y sustrato (acetato o 4CF) fue añadida y se monitoreo la cantidad de oxígeno disuelto en el reactor. La respiración endógena fue medida utilizando solo nutrientes. La TECO fue determinada por medio de la pendiente del consumo de oxígeno dividida por la concentración de SSV.

### **Aclimatación**

El reactor fue inoculado con lodos activados provenientes de una planta de tratamiento de lodos activados municipal conteniendo una cantidad 2000 mgVSS/L. La biomasa fue aclimatada por medio de la estrategia de tiempos variables, en la cual la duración de la fase de reacción fue variable y detenida cuando la remoción del 4CF fuera igual o mayor a 95%. El diseño experimental consideró tres diferentes bloques de experimentos con una concentración inicial 4CF: 50, 100 y 200 mg/L (llamados AC50, AC100 y AC200, respectivamente. Cada experimento fue iniciado con lodos activados recientes, es decir directamente de la planta, a excepción del caso AC200, el cual el inóculo fue previamente aclimatado a la degradación de 100 mg/L.

### **Desaclimatación (Ayunos)**

La biomasa aclimatada fue expuesta a diferentes periodos de ayuno, los cuales fueron introducidos manteniendo la aireación el tiempo necesario después de que la degradación del 4CF fue completada, es otras palabras, los microorganismos se mantuvieron en condiciones endógenas. Para cada biomasa aclimatada a 50, 100 y 200mg/L (DA50, DA100 y DA200) distintos tiempo de ayuno fueron estudiados. Para DA50: 8, 12 y 24h, DA100: 12 y 24 h, y DA200: 12, 24 y 36 h. Para cada experimento, se siguieron las cinéticas de degradación y la TECO antes y después del periodo de ayuno. Para cada bloque de condiciones se utilizó el mismo

reactor. En cada una de las condiciones de ayuno la biomasa fue recuperada a su actividad inicial máxima, es decir, la actividad observada antes de ser expuesta al ayuno, esto se realizó integrando una fase de aclimatación pequeña aclimatación hasta recobrar el tiempo de degradación observado antes del ayuno.

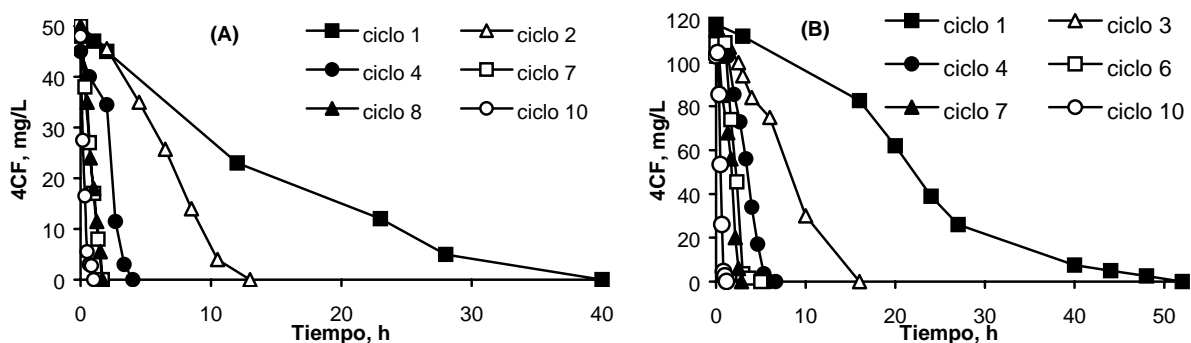
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Proceso de aclimatación

Para las dos concentraciones de 4CF usadas, la aclimatación fue obtenida en 10 ciclos de degradación. Durante la aclimatación, el 4CF fue degradado con eficiencias mayores al 99% como 4CF y mayor de 95% como DQO y COD. Durante la aclimatación de los lodos activados la relación entre la concentración residual del 4CF y el tiempo de degradación gradualmente fue cambiando y una vez alcanzada la máxima actividad se volvió constante.

En el caso de de DA50, el tiempo de degradación se redujo de 40 h a 50 min, después de 75 h (del ciclo 1 al ciclo 10)(Fig. 2A). Para DA100 (Fig. 2B) el tiempo de degradación se redujo de 52 a 1.16 h, después de 125 h (del ciclo 1 al 10). Se observó que existe un incremento proporcional en el periodo de aclimatación cuando la concentración inicial del tóxico es incrementada de 50 a 100 mg/L (75 vs 125 h).

Cuando el inóculo pre-aclimatado a 100 mg/L de 4CF (DA200) fue expuesto a un incremento de 100% de la concentración inicial, la degradación fue afectada levemente. El primer ciclo de degradación de DA200 llevo solamente 2.5h para remover el 100% de la concentración inicial de 4CF. Después de 5 ciclos, el tiempo de degradación fue reducido a 1.75 h (del ciclo 1 al 6). Este resultado indica que durante la aclimatación DA200 los microorganismos que se multiplican en esta fase desarrollan la actividad enzimática necesaria para la degradación del tóxico. Se observó que al doblar la concentración inicial de 4CF solo generó un incremento proporcional en el tiempo de degradación.



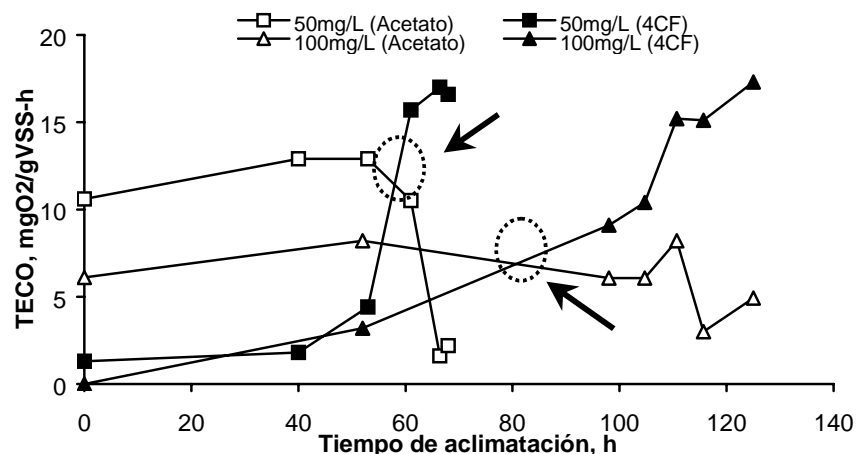
**Figura 2.** Cinéticas de degradación durante el proceso de aclimatación al 4CF . A) Aclimatación a 50 mg /L y B) Aclimatación a 100 mg/L

Cuando la biomasa fue completamente aclimatada al 4CF, los ciclos siguientes mostraron una curva de degradación similar, independientemente de la concentración inicial de la aclimatación. Se ha observado que los microorganismos aclimatados podrían degradar concentraciones de 4CP hasta 1400 mg/L (Buitrón *et al.*, 2003).

### Actividad de los microorganismos en la aclimatación

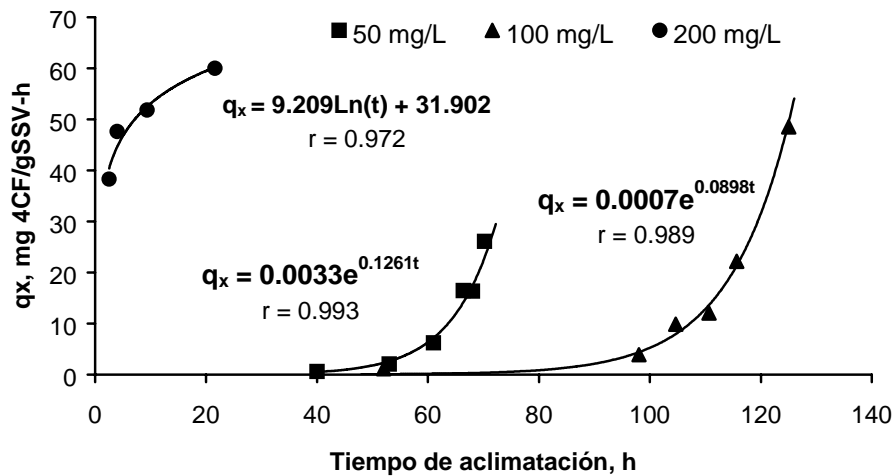
La figura 3 presenta la evolución de la TECO registrada durante la aclimatación. Se llevaron a cabo dos experimentos en paralelo, el primero fue la TECO medida en un minireactor con acetato como sustrato y en el segundo 4CF. En ambos casos el sustrato fue empleado como única fuente de carbono y energía, la respiración endógena fue empleada al hacer los cálculos.

Cuando la aclimatación es concluida, se observa un incremento en la la TECO del 4CF. En caso de la TECO del acetato la respuesta fue contraria a la del 4CF. En la figura 3 se puede observar el punto de cruce a las 60 h y 80 h para el caso de AC50 y AC100, respectivamente. Se puede considerar que después de este punto, la afinidad del consorcio es mayor hacia el compuesto tóxico, aun mayor que hacia un sustrato fácilmente biodegradable como lo es el acetato.



**Figura 3.** Evolución de la tasa específica de consumo de oxígeno (TECO) para los microorganismos aclimatados al 4CF. Las flechas indican el punto de cruce donde la actividad al consumo de 4CF es mayor a la actividad de consumo de acetato

La figura 4 presenta la tasa específica de degradación,  $q_x$ , como una función del tiempo de aclimatación. La variación de la  $q_x$  durante la aclimatación fue relacionada con una correlación exponencial. Es posible observar que después del punto de cruce discutido anteriormente, la  $q_x$  se incrementa exponencialmente (ver el caso de la aclimatación a 100mg/L). Por lo anterior, podemos considerar que existe un punto en donde la afinidad de las comunidades pueden girar bruscamente a la degradación de compuestos tóxicos, y después, la tasa de degradación se incrementa rápidamente y se estabiliza.



**Figura 4.** Evolución de la tasa específica de degradación,  $q_x$ , como una función del tiempo de aclimatación. La tasa de degradación fue evaluada dividiendo la concentración de 4CF entre el tiempo necesario para degradar más del 99% de la concentración original y es dividido por la cantidad de SSV en el reactor

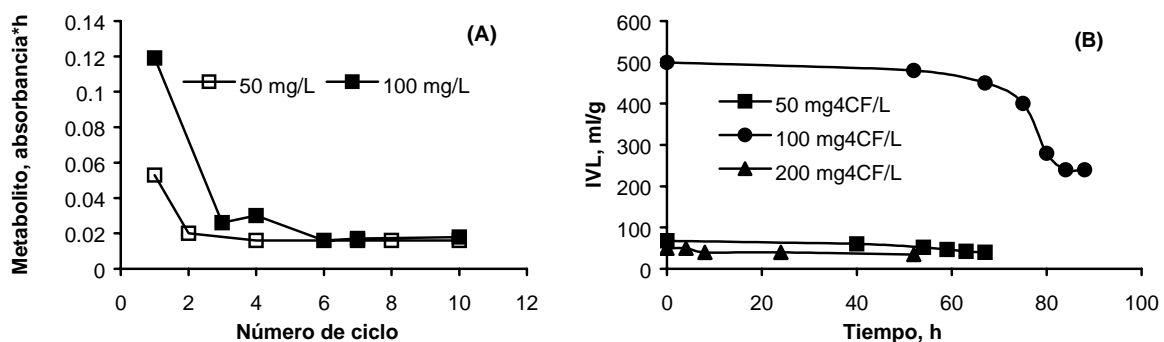
Cuando la biomasa aclimatada fue expuesta a una concentración mayor de 4CF, el tiempo de aclimatación fue menor que el tiempo necesario para un lodo no aclimatado, como se muestra en la figura 4 para la  $q_x$  obtenida para el caso de AC200. En este caso, una relación logarítmica se obtuvo como explicación de la variación de la  $q_x$ . Esto indica que después de la aclimatación es completada, no existe más el crecimiento exponencial, por lo cual se estabiliza en un punto donde el valor es el mayor. Se debe tener cuidado cuando la aclimatación es realizada, ya que si se ingresa una cantidad elevada de tóxico (mayor a la concentración inhibitoria) existirán problemas y la aclimatación no se llevaría a cabo. Moreno y Buitrón (2003) observaron que esta inhibición no solo es función de la concentración inicial del compuesto tóxico, sino también de la concentración inicial de biomasa. En general, una concentración baja de biomasa puede producir un alto grado de inhibición. Por esta razón la aclimatación se debe realizar con valores bajos de la relación sustrato/microorganismos.

### Producción de metabolito en la aclimatación

El metabolito ácido semialdehído 5-cloro-2hidroxi- mucónico (Comandeur y Persons, 1990) es un compuesto formado como una vía alterna de degradación del 4CF por los microorganismos y puede ser inhibitorio a bajas concentraciones. La figura 5A muestra la producción de metabolito durante la aclimatación. Con el fin de tomar en cuenta la producción de metabolito, se determinó la cantidad generada de este por medio de la absorbancia generada en el ciclo de degradación (bajo el área de la curva), es decir, el metabolito se contabilizó como absorbancia/hora. Se observó que las cantidades más altas de metabolito se generaron al inicio de la aclimatación. Cuando las bacterias se adaptan, la producción del metabolito tóxico disminuye de 0.053 a 0.016 (para AC50) y de 0.110 a 0.018 (para AC100) unidades de absorbancia/hora. La aparición de metabolito también se presenta como un indicativo de problemas en la operación de los reactores que degradan clorofenoles, debido a una desaclimatación de los microorganismos.

## Índice volumétrico de lodos en la fase de aclimatación

Durante la aclimatación el índice volumétrico de lodos (IVL) disminuye (Figura 5B). Es claro que las bacterias filamentosas que se encontraban en el inóculo usadas en el experimento AC100 fueron eliminadas por el compuesto tóxico. En general los microorganismos que degradan el 4CF tienen excelentes propiedades de sedimentación. Incluso para un inóculo problemático (por ejemplo el empleado en AC100), el IVL disminuye 500 a 240 mL/g después de 10 ciclos de operación, y a 70 después de 20 ciclos más (ver valores para 200 mg 4CF/L). Lo anterior se debe a la formación de gránulos aerobios, frecuentemente encontrados en los sistemas SBR.

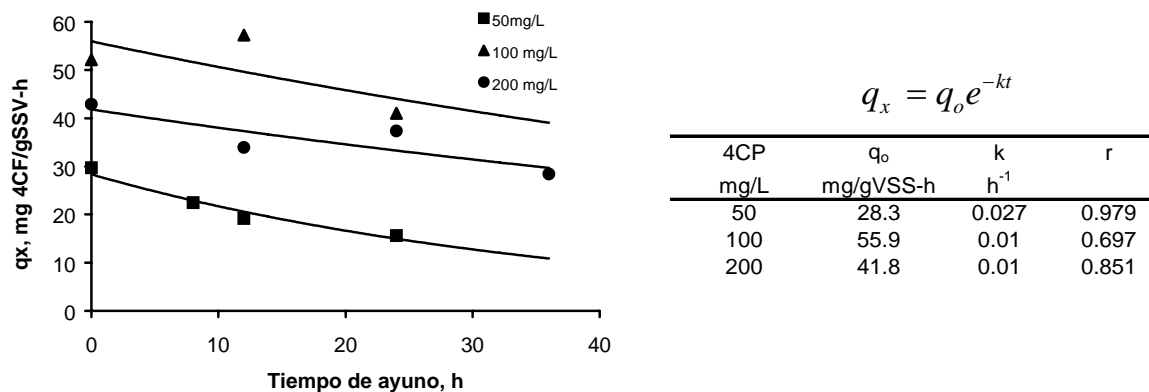


**Figura 5.** (A) Producción de metabolito durante la aclimatación; (B) Evolución del IVL durante la aclimatación al 4CF

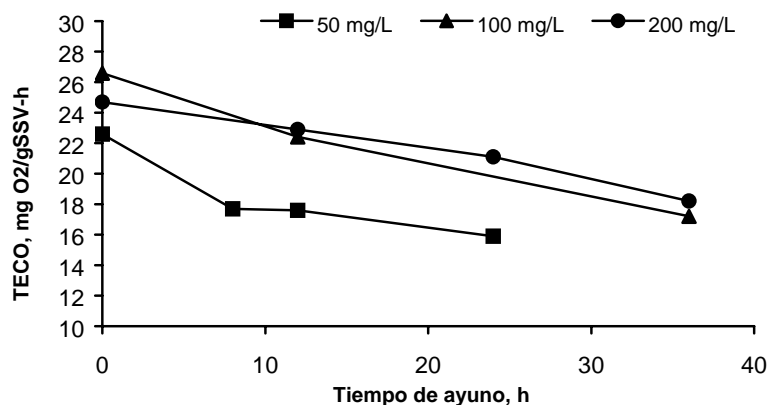
## Desaclimatación inducida por ayuno

Las figuras 6 y 7 presentan la influencia del ayuno en la  $q_x$  y la TECO. Es posible notar que los ayunos disminuyen gradualmente la actividad microbiana. En general, un decremento de 21 a 44% se observó en la  $q_x$  debido a la introducción de periodos de ayuno, y de 26 a 35 % de pérdida de actividad medida como TECO (Figura 7). Se encontró que la  $q_x$  fue altamente correlacionado con la negativa exponencial del tiempo de ayuno, independientemente de la concentración inicial a la que estaba aclimatado el consorcio. (figura 6).

Es interesante notar que la estrategia como se realice los ayunos influye sobre los resultados obtenidos. Buitrón *et al.*, (1994) realizaron ayunos en un mismo reactor empleando diversas y consecutivos periodos de ayuno de 24 h, observando que el tiempo de degradación se incremento mas de 6 veces del valor inicial, generando una reducción del 80% en la  $q_x$ . En el presente estudio, la biomasa en el reactor fue aclimatada, y después se realizaron diversos experimentos de desaclimatación para cada concentración. Entre cada ayuno, se realizaron varios ciclos más, con los cuales se recuperó la actividad inicial de la biomasa (es decir antes del ayuno), posteriormente el siguiente ayuno era aplicado. Este procedimiento genera una biomasa con historia, con lo cual, aparentemente por esta estrategia de desaclimatación controlada disminuye los efectos sobre la biomasa debido a ayunos. En la figura 7 para el caso de DA100 y DA200 es posible observar que después de un ciclo de ayuno existe un incremento en el valor de la  $q_x$  indicando una reducción en el tiempo de degradación. En este caso se observa una influencia positiva debido a la aplicación de ayunos.



**Figura 6.** Influencia del tiempo de ayuno sobre la tasa específica de remoción. Los resultados son comparados con las condiciones iniciales antes de la perturbación. El modelo es representado en la figura, y los coeficientes se muestran en la tabla del lado derecho



**Figura 7.** Influencia del tiempo de ayuno sobre la TECO. Los resultados después del ayuno son comparados con las condiciones iniciales antes del ayuno

Algunos estudios han examinado los efectos de un pre-ayuno en las células inoculadas. Se ha reportando que el ayuno ayuda a incrementar la permanencia de estas células en los sistemas de tratamiento (Van Elsas et al., 1994), mientras que otro estudio, ha documentado que el pre-ayuno no ejerció ningún efecto significativo sobre la permanencia (Van Overbeek *et al.*, 1995). La inconsistencia pudo haber sido debido a las diversas condiciones del ayuno usadas en esos estudios. El punto que a ser considerado es que durante el ayuno existe una disminución de la densidad de la población, tasa de respiración, la actividad deshidrogenasa y la actividad hacia el consumo de fenol lo cual puede afectar el funcionamiento de una planta de tratamiento de aguas residuales. Watanabe *et al.* (2000) también demostraron un aumento en la hidrofobicidad de la superficie de la célula y la capacidad de la adherencia del flóculo debido al ayuno. Por lo tanto, es posible considerar que los microorganismos, conforme están sujetos a los ciclos de ayuno-recuperación del ayuno, cambiaron sus propiedades hidrofóbicas con el fin de protegerse. De esta manera las células ayunadas se adhieren a los flóculos de los otros microorganismos presentes en el reactor y participan en el proceso de degradación. Sin embargo, en la práctica, las plantas de



tratamiento de aguas residuales industriales están sujetas a los cambios al azar de la concentración tóxica que aumentan el riesgo del desaclimatación de los microorganismos por una variación importante de la actividad de los microorganismos.

## CONCLUSIONES

Los resultados demostraron una reducción en el tiempo de la degradación mientras que ocurrió el proceso de aclimatación. En el caso de 50 mg 4CF/L, tiempo de la degradación fue reducido de 40 h a 50 minutos. Se observó que hay un incremento proporcional en el tiempo de aclimatación con la concentración inicial del tóxico cuando se aumento de 50 a 100 mg/L. Una vez que la biomasa fue aclimatada, se encontró un aumento en la afinidad del consorcio para biodegradar el 4CF, mientras que la capacidad de biodegradar el acetato disminuyó. Existe una disminución en la producción del metabolito tóxico cuando las bacterias estuvieron adaptadas a la degradación de 4CF. La aclimatación al 4CF aumenta la capacidad de sedimentación de la biomasa.

El ayuno generó una disminución en la actividad microbiana. En general, un decremento de 21 a 44 % fue observado en la  $q_x$  debido a la introducción de los períodos del ayuno, de 26 a 35 % de pérdida de actividad medido como TECO. El grado del desaclimatación de los microorganismos en ayuno parece ser determinado por la historia de la biomasa. El efecto del ayuno sobre la tasa de degradación es menos significativo cuando los microorganismos son puestos en condiciones de ayuno, recuperados y después ayunados otra vez, no así en el caso donde los ayunos son cíclicos y no hay un período de la recuperación. En cualquier caso, existe un decremento de la actividad de los microorganismos generado por la variación del tóxico, por lo cual una desaclimatación de la biomasa aclimatada podría explicar las variaciones en el funcionamiento de las plantas de tratamiento aguas residuales industriales tóxicas. Se observó que las tasas específicas de la degradación durante la aclimatación (aumento) y el proceso del desaclimatación (disminución) siguió un modelo exponencial.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo incluye resultados de el proyecto EOLI el cual es patrocinado por el programa INCO de la Unión Europea (ICA4-CT-2002-10012). Iván Moreno agradece al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM y a CONACYT por el apoyo otorgado.

## REFERENCIAS

- Aelion C. M., Dobbins D.C. y Pfaender F. K. (1989). Adaptation of aquifer microbial communities to the biodegradation of xenobiotic compounds: influence substrate concentration and preexposure. *Environ. Toxicol. Chem.* **8**, 75-86.
- AFNOR (1985). Evaluation en milieu aqueux de la biodegradabilité aérobie "ultime" des produits organiques solubles. *Normalisation française*, NFT 90-312.
- Buitrón G., Capdeville B. y Horny P. (1994). Improvement and control of the microbial activity of a mixed population for degradation of xenobiotic compounds. *Water Science and Technology*, 29 (7), 317-329.

- Buitrón G. y Moreno J. (2004). Modeling of the acclimation/deacclimation processes of a mixed culture degrading 4-chlorophenol. *Water Science and Technology*, **49** (1), 79-86.
- Buitrón G., Schoeb M.-E. y Moreno J. (2003). Automated Sequencing Batch Bioreactor Under Extreme Peaks of 4-Chlorophenol *Water Science and Technology* **47** (10), 175–181.
- Coello M.D., López-Ramírez J.A., Sales D. y Quiroga J.M. (2003). Evolution of an activated sludge system under starvation conditions. *Chem. Eng. Journal*, **94**, 139-146.
- Commandeur L.C.M. y Parson J.R. (1990). Degradation of halogenated aromatic compound.. *Biodegradation*, **1**, 2007-220.
- Moreno I. y Buitrón G. (2004). Influence of the origin of the inoculum on the anaerobic biodegradability test, *Water Science and Technology*, **49** (1), 53-59
- Moreno I. y Buitrón G. (2003). Influence of the initial substrate to microorganisms concentration ratio on the methanogenic inhibition test, *Water Science and Technology*, **48** (6)
- Standard Methods for Examination of Water and Wastewater* (1992). 18<sup>th</sup> ed. American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington D.C. U.S.A
- Van Elsas J. D., Wolters A.C., Clegg C.D., Lappin-Scott H.M. y Anderson J.M. (1994). Fitness of genetically modified *Pseudomonas fluorescens* in competition for soil and root colonization. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **13**, 259-272.
- Van Overbeek L.S., Eberl L., Givskov M., Molin S. y Van Elsas J. D (1995). Survival of, and induced stress resistance in, carbon-starved *Pseudomonas fluorescens* cells residing in soil. *App. Environ. Microbiol.*, **61**, 4202-4208.
- Watanabe K., Miyashita M. y Harayama S. (2000). Starvation improves survival of bacteria introduced into activated sludge. *App. Environ. Microbiol.*, **66**, 3905-3910.
- Wiggings B.A., Jones S.H. y Alexander M.A. (1987). Explanations for the acclimation period preceding the mineralization of organic chemicals in aquatic environments. *App. Environ. Microbiol.*, **53**, 791-796.