

Resumen

Recientemente está recibiendo gran aceptación el tratamiento integrado quimicobiológico de aguas residuales que contienen compuestos orgánicos difícilmente biodegradables. Sin embargo, estudios realizados con aguas sintéticas con ácido *p*-cumárico mostraron que el tratamiento químico previo al tratamiento biológico no mejoraba su degradación. En este trabajo se han aislado e identificado estirpes bacterianas capaces de crecer a las máximas concentraciones de los compuestos resultantes de los tratamientos químicos, oxidación húmeda y ozonización, así como del ácido *p*-cumárico sin tratar, con objeto de conseguir un inóculo con alto potencial degradador de estas aguas residuales.

Palabras clave:

Aguas residuales industriales, biodegradación, compuestos recalcitrantes, selección bacteriana.

Abstract***p*-Coumaric acid biodegradation improvement by bacterial selection**

Over the last years, the treatment of wastewaters containing recalcitrant organic compounds by means of integrated chemical-biological processes has received a lot of attention. Nevertheless, studies with synthetic waters with acid *p*-coumaric showed that the chemical treatment before the biological one did not improve its degradation. In this work, we have selected several bacterial strains in order to obtain an inoculum with a high degradative potential of this compound and its intermediates from the chemical pre-treatment.

Keywords:

Bacterial selection, biodegradation, industrial wastewater, recalcitrant compounds.

Estrategia para la mejora de la degradación del ácido *p*-cumárico mediante selección bacteriana

Por: E. Otal, C. Arnáiz (*), J.C. Gutiérrez (**) y J. Lebrato (***)

(*) Universidad de Sevilla

Escuela Universitaria Politécnica
Departamento de Ingeniería Química y Ambiental
C/ Virgen de África 7
41011 Sevilla
E-mail: eotal@us.es

() Abensur Servicios Urbanos**

Avda. de la Buhaira, 2
41018 Sevilla

(*) Universidad de Sevilla**

Escuela Universitaria Politécnica
Grupo TAR

1. Introducción

La mayoría de la información disponible sobre las vías metabólicas de degradación de compuestos orgánicos difícilmente biodegradables, proviene de la utilización de cultivos puros o cultivos mixtos bien definidos, en sistemas relativamente simples y con la utilización de un solo compuesto. La información que se obtiene de esta forma es importante, puesto que permite caracterizar la capacidad metabólica de microorganismos que han sido aislados e identificados, además de predecir la eficiencia de depuración en condiciones controladas con un cultivo definido.

Sin embargo, los procesos de depuración industriales no están tan controlados al ser la escala de funcionamiento mucho mayor y, normalmente, no se dan condiciones de esterilidad. Ello implica que en un sistema de tratamiento biológico a escala industrial se establezcan cultivos mixtos de distintos microorganismos en una comunidad que opera en condiciones físicas y químicas

cambiantes. Por tanto, es extremadamente peligroso extrapolar la información obtenida sobre metabolización por cultivos definidos y controlados a la degradación de compuestos orgánicos a escala industrial.

Cuanto más compleja sea la secuencia de degradación requerida para eliminar un contaminante difícilmente biodegradable, menos probable será encontrar todas las enzimas necesarias en un mismo organismo. Así, es fácil encontrar que un tipo de microorganismo sea capaz de transformar parcialmente una molécula determinada, bien por utilización parcial o por cometabolismo, pero no pueda mineralizarla. Sin embargo, una población mixta puede conseguir la mineralización completa de un compuesto recalcitrante, por la combinación de actividades de distintos miembros de la comunidad, si en ella existen tipos de bacterias capaces de utilizar el producto de la degradación parcial del sustrato original, que fue llevada a cabo por otro tipo de bacteria

[1,2]. Es un hecho observado en distintos sistemas de tratamiento que para efectuar la conversión completa de un compuesto difícilmente biodegradable que satisfaga los requerimientos nutricionales y energéticos del crecimiento microbiano, se requieren miembros independientes de la comunidad.

El éxito de cada proceso de degradación depende de varios factores: de las características de los microorganismos (biomasa, concentración, diversidad de la población y especificidades enzimáticas), del sustrato (características físico-químicas, estructura molecular y concentración) y de factores ambientales (pH, temperatura, potencial redox, disponibilidad de aceptores de electrones y fuentes de carbono y energía). Estas variables pueden afectar al tiempo de aclimatación de los cultivos a los sustratos o al medio ambiente, y a la eficiencia del proceso.

La bioquímica de los compuestos difícilmente biodegradables en comunidades microbianas mixtas está, por tanto, relacionada con la estructura y la función de los miembros de la misma. Como consecuencia, además de conocer los procesos bioquímicos de metabolización de contaminantes, es necesario ensayar la capacidad de degradación en condiciones operacionales con poblaciones naturales mixtas.

En este trabajo se escogió el ácido *p*-cumárico [ácido 3-(4-hidroxifenil)-2-propenoico o ácido *p*-hidroxicinámico], de fórmula $C_9H_8O_3$, como compuesto representativo de compuestos recalcitrantes presentes en las aguas residuales de las industrias agroalimentarias (Figura 1).

El ácido *p*-cumárico se ha encontrado en el molido de la aceituna [3], en el alpechín [4], en las aguas de destilerías de vino (vinazas) [5], en el aceite de oliva virgen [6], en el vino tinto [7] y en la mostaza [8]. Además, el ácido *p*-cumárico, junto con los ácidos relacionados ferúlico y cinámico (Figura 1) entre otros, es intermediario de la degradación

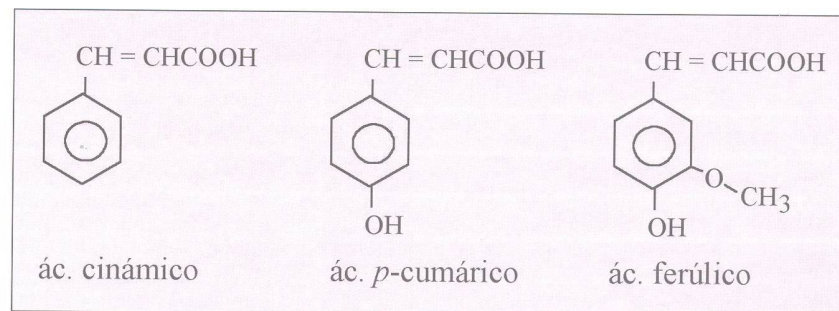


Figura 1. Estructura química del ácido *p*-cumárico y sus ácidos relacionados.

bacteriana de residuos lignocelulósicos [9].

A lo largo de la última década, está recibiendo una especial aceptación el tratamiento de aguas residuales que contienen compuestos orgánicos de difícil tratabilidad por medio de sistemas en los que se integran tratamientos químicos y biológicos [10-14]. En estos trabajos se destaca el potencial de una primera fase de tratamiento químico para convertir los compuestos biorresistentes en compuestos intermedios realmente más biodegradables en el proceso biológico posterior. De igual manera, el tratamiento biológico previo puede eliminar la fracción biodegradable del agua residual que contenga una mezcla de compuestos recalcitrantes y biodegradables, consiguiendo un ahorro en los oxidantes químicos, aplicados sólo a la fracción remanente.

Manzavinos y col. [15,16] y Andreozzi y col. [17] emplearon respectivamente la oxidación húmeda y la ozonización como pretratamientos químicos enfocados a una posible mejora de la biodegradabilidad del ácido *p*-cumárico. Los compuestos intermedios de dicha degradación química fueron de dos tipos: a) compuestos aromáticos tales como *p*-hidroxi-benzaldehído, ácido *p*-hidroxi-benzoico, hidroquinona y fenol y b) productos fácilmente biodegradables como los ácidos oxalacético, oxálico y fórmico. Por lo tanto, un tratamiento químico-biológico integrado parece ser a priori adecuado para la degradación del ácido *p*-cumárico. Sin embargo, estudios realizados con aguas sintéti-

cas procedentes de los tratamientos anteriores mostraron que el tratamiento químico previo al tratamiento biológico del ácido *p*-cumárico no mejoraba su degradación [18].

La degradación del ácido *p*-cumárico también ha sido estudiada mediante cultivos bacterianos puros [19-24]. Estos trabajos estaban enfocados fundamentalmente, al metabolismo y caracterización de capacidades degradativas de especies bacterianas concretas. Por tanto, poblaciones mixtas de microorganismos seleccionados con la habilidad de degradar o mineralizar ácido *p*-cumárico y alguno de los intermedios de su preoxidación química podrían formar la base de un tratamiento biológico para la depuración de aguas residuales que contengan dichos compuestos.

El objetivo de este trabajo ha sido el aislamiento e identificación de estirpes bacterianas capaces de crecer a las máximas concentraciones de los compuestos resultantes de los tratamientos químicos, oxidación húmeda y ozonización (*p*-hidroxi-benzaldehído, *p*-hidroxi-benzoico, hidroquinona y fenol), así como del ácido *p*-cumárico sin tratar, con objeto de conseguir un inóculo con alto potencial degradador de estas aguas residuales.

2. Material y métodos

El inóculo inicial de este trabajo fue fango anaerobio procedente de una depuradora de aguas residuales urbana, cuya caracterización aparece en la Tabla 1.

Para el aislamiento e identificación de bacterias capaces de crecer

Parámetro	Valor
pH	7,5
Sólidos en Suspensión Totales (SST)	11.800 mg/L
Sólidos en Suspensión Volátiles (SSV)	8.365 mg/L
Sólidos en Suspensión No Volátiles (SSNV)	3.435 mg/L
DQO	9.379 mg/L
COT	3.473 mg/L

Tabla 1. Caracterización del fango anaerobio de partida procedente de una Estación Depuradora de Aguas Residuales Urbana.

SOLUCIÓN A		SOLUCIÓN B	
Compuesto	g/L	Compuesto	g/L
KH ₂ PO ₄	10,88	NH ₄ Cl	106
K ₂ HPO ₄	73,12	CaCl ₂	5,96
		MgCl ₂ ·6H ₂ O	10
SOLUCIÓN C		SOLUCIÓN D	
Compuesto	g/L	Compuesto	g/L
1 EDTA AC (Libre)	64	MnCl ₂ ·4H ₂ O	5
KOH	56	H ₃ BO ₃	0,5
2 SO ₄ Fe·7H ₂ O	54,8	ZnCl ₂	0,5
Mezclar las soluciones 1 y 2.		CuCl ₂ ·2H ₂ O	0,38
Burbujear 12 horas, cubierto con algodón.		(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₄ ·4H ₂ O	0,08
		CoCl ₂ ·6H ₂ O	5
		NiCl ₂ ·6H ₂ O	0,5
		Na ₂ SeO ₃	0,5

Composición para 1L: 40 mL/L Sol. A, 10 mL/L Sol. B, 1 mL/L Sol. C y 100 µL/L Sol. D
 Todas las soluciones fueron autoclavadas por separado antes de mezclarlas.

Tabla 2. Composición del medio mínimo mineral.

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN (g/L)
p-cumárico	1
fenol	1
p-hidroxibenzaldihido	1
p-hidroxibenzoico	1
hidroquinona	2

Tabla 3. Máxima concentración de cada compuesto que permite el crecimiento en medio mínimo sólido.

de estos compuestos, como única fuente de carbono y energía, en un medio mínimo mineral (Tabla 2).

Las bacterias procedentes de estos cultivos de enriquecimiento, a la máxima concentración del compuesto tolerada, fueron aisladas en medio sólido con el compuesto como única fuente de carbono y energía.

Las estirpes más tolerantes a los compuestos estudiados fueron identificadas por el sistema MIDI/Hewlett Packard Microbial Identification System (MIS), que se basa en la composición de los ácidos grasos de las membranas celulares.

3. Resultados y discusión

La máxima concentración tolerada de ácido p-cumárico y de cada uno de los intermedios ensayados por las estirpes aisladas en los medios sólidos se muestra en la Tabla 3. Se aislaron un total de 17 estirpes que crecieron a las máximas concentraciones estos compuestos (Tabla 4). Aunque Pseudomonas fue el microorganismo predominante, se obtuvieron una gran variedad de bacterias, tanto Gram positivas como Gram negativas. Incluso se aisló un microorganismo eucariótico, que creció con hidroquinona como fuente de carbono, una levadura del género Candida.

Cuando se selecciona una bacteria capaz de utilizar un determinado compuesto, ésta no necesariamente ha de ser capaz de crecer en otros compuestos distintos, dado que las capacidades metabólicas son bastante específicas. Esto es lo que se observa en términos generales con las bacterias aisladas en este trabajo.

Las estirpes TS01-TS10, aisladas del enriquecimiento con p-cumárico, fueron a su vez capaces de crecer utilizando ácido p-hidroxibenzoico como única fuente de carbono y energía. Las estirpes TS11-TS13, aisladas del enriquecimiento con p-hidroxibenzaldihido fueron a su vez capaces de crecer con ácido p-hidroxibenzoico

utilizando ácido p-cumárico y los compuestos intermedios producidos por oxidación húmeda y ozoniza-

ción, se realizaron cultivos de enriquecimiento en medio líquido con-teniendo concentraciones crecientes

Tabla 4

Estirpe	Fuente de carbono y energía				
	p-C	F	p-Ha	p-Ho	Hq
TS01. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	-	-	+	-
TS02. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	-	-	+	-
TS03. <i>Acinetobacter baumannii</i>	+	-	-	+	-
TS04. <i>Alcaligenes xylosoxydans</i>	+	-	-	+	-
TS05. <i>Curtobacterium flaccumfacies</i>	+	-	-	+	-
TS06. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	-	-	+	-
TS07. <i>Alcaligenes xylosoxydans</i>	+	-	-	+	-
TS08. <i>Alcaligenes faecalis</i>	+	-	-	+	-
TS09. <i>Alcaligenes xylosoxydans</i>	+	-	-	+	-
TS10. <i>Comamonas testosteroni</i>	+	-	-	+	-
TS11. <i>Bordetella bronchiseptica</i>	-	-	+	+	-
TS12. <i>Alcaligenes xylosoxydans</i>	-	-	+	+	-
TS13. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	+	+	-
TS14. <i>Rhodococcus rhodochrous</i>	-	+	-	-	-
TS15. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	+
TS16. <i>Candida sp.</i>	-	-	-	-	+
TS17. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	+

Tabla 4. Estirpes aisladas a la máxima concentración de la fuente de carbono y energía correspondiente. (p-C: p-cumárico; F: fenol; p-Ha: p-hidroxibenzaldehído; p-Ho: p-hidroxibenzoico; Hq: hidroquinona. +: crecimiento; -: no crecimiento).

co. Sin embargo, el resto de las estirpes sólo fueron capaces de crecer en el compuesto que se utilizó para su enriquecimiento.

Sin embargo, todas las bacterias seleccionadas como utilizadoras de p-cumárico fueron también capaces de crecer con p-hidroxibenzoico, lo que indica que en estas bacterias, el p-hidroxibenzoico debe ser un intermediario en la ruta de degradación del p-cumárico. Ello implicaría que inicialmente degraden el radical propenoico, liberando acetilCoA. Este ataque inicial debe ser un mecanismo oxidativo que genere directamente p-hidroxibenzoico, en vez de un mecanismo no oxidativo que generaría p-hidroxibenzaldehído, el cual debería oxidarse posteriormente hasta p-hidroxibenzoico, pues estas bacterias no son capaces de utilizar el p-hidroxibenzaldehído. Estos datos concuerdan con los resultados publicados previamente con una cepa degradadora del género *Acinetobacter* [20].

4. Conclusiones

Teniendo en cuenta los resultados negativos obtenidos con los tratamientos integrados químico-biológicos en la degradación de ácido p-cumárico, el enriquecimiento de las estirpes seleccionadas es probablemente la estrategia más adecuada para mejorar la degradación biológica de aguas residuales industriales que contengan ácido p-cumárico.

5. Bibliografía

- [1] D. Grbic-Galic, y Vogel, T.M., Transformation of toluene and benzene by mixed methanogenic cultures, *Appl. Environ. Microbiol.*, 53 (1987) 254-260.
- [2] D.R. Shelton, y J. M. Tiedje, Isolation and partial characterization of bacteria in an anaerobic consortium that mineralizes 3-chlorobenzoic acid, *Appl. Environ. Microbiol.*, 48 (1984) 840-848.
- [3] A.V. Roncero, M.M. Duran y E.G. Constante, Componentes fenólicos de la aceituna II. Polifenoles del alpechín (Phenolic compounds in olive fruits. II. Polyphenols in vegetation water), *Grasas y Aceites*, 25 (1974) 341-345.
- [4] R. Borja, A. Martín, R. Maestro, J. Alba y J.A. Fiestas, Enhancement of the anaerobic digestion of olive mill wastewater by the removal of phenolic inhibitors, *Proc. Biochem.*, 27 (1992) 231-237.
- [5] R. Borja, A. Martín, R. Maestro, M. Luque y M.M. Duran, Enhancement of the anaerobic digestion of wine distillery wastewater by the removal of phenolic inhibitors, *Biores. Technol.*, 45 (1993) 99-104.

Equipos para medir pH, conductividad y oxígeno disuelto en el tratamiento de aguas

Hemos convertido la parte más frágil del sistema en la razón más sólida de nuestro éxito.

Una membrana excepcional de elevada resistencia mecánica y química.

- una fina malla de acero inox. que actúa de soporte
- una capa de silicona que impregna y recubre ambos lados de la malla
- dos láminas de PTFE, una a cada lado de la silicona, le confieren mayor resistencia física y dificultan la adhesión de microorganismos a su superficie



Crison Instruments, S.A.
Riera Principal, 34-36
08328 ALELLA (Barcelona)
Tel. 935 409 003
Fax 935 403 001
E-Mail c.pro@crison.es

CRISON


- [6] M. Tsimidou, G. Papadopoulos y D. Boskou, Determination of phenolic compounds in virgin olive oil by reversed-phase HPLC with emphasis on UV detection, *Food Chem.*, 44 (1992) 53-60.
- [7] M.H. Salagoity-Auguste y A. Bertrand, Wine phenolics-analysis of low molecular weight components by high performance liquid chromatography, *J. Sci. Food Agric.*, 35 (1984) 1241-1247.
- [8] H. Kozłowska, D.A. Rotkiewicz, R. Zadernowski y F.W. Sosulski, Phenolic acids in rapeseed and mustard, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 60 (1983) 1119-1123.
- [9] C. Trigo y A. Ball, Is the solubilized product from the degradation of lignocellulose by actinomycetes a precursor of humic substances?, *Microbiology*, 140 (1994) 3145-3152.
- [10] A.R. Wilhelmi y R.B. Ely, A two-step process for toxic wastewaters, *Chem. Eng. J.*, 2 (1976) 105-109.
- [11] W.M. Copra, R.W. Lehmann y T.J. Vollstedt, Technology for the Nineties. In: Proc. of the 2nd Int. Symp. on Chem. Oxidation, W.W. Eckenfelder, A.R. Bowers y J.A. Roth (ed). Technomic Publ. Co., Lancaster, (1992) 328-355.
- [12] O.J. Hao, K.K. Phull y J.M. Chen, Wet oxidation of TNT red water and bacterial toxicity of treated waste, *Water Res.*, 28 (1994) 283-290.
- [13] S.H. Lin y T.S. Chuang, Wet air oxidation and activated sludge treatment of phenolic wastewater, *J. Environ. Sci. Health A.*, 29 (1994) 547-564.
- [14] V.S. Mishra, V. Padiyar, J.B. Joshi, V.V. Mahajani y J.D. Desai, Treatment of acrylonitrile plant wastewater, *Trans IChemE. B.*, 73 (1995) 243-251.
- [15] D. Mantzavinos, R. Hellenbrand, A.G. Livingston y I.S. Metcalfe, Catalytic wet oxidation of *p*-coumaric acid: partial oxidation intermediates, reaction pathways and catalyst leaching, *Appl. Catal. B-Environ.*, 7 (1996^a) 379-396.
- [16] D. Mantzavinos, R. Hellenbrand, I.S. Metcalfe y A.G. Livingston, Partial wet oxidation of *p*-coumaric acid: oxidation intermediates, reaction pathways and implications for wastewater treatment, *Wat. Res.*, 30 (1996b) 2969-2979.
- [17] R. Andreozzi, V. Caprio, M.G. D'Amore y A. Insola, *p*-Coumaric acid abatement by ozone in aqueous solution, *Wat. Res.*, 29 (1995) 1-6.
- [18] E. Ota, Tratamiento integrado químico-biológico de compuestos difícilmente biodegradables, Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla (1998).
- [19] G. Degrassi, P. Polverino de Loreto y C.V. Bruschi, Purification and characterization of ferulate and *p*-coumarate decarboxylase from *Bacillus pumilus*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 61 (1995) 326-332.
- [20] D. Delneri, G. Degrasse, R. Rizzo y C.V. Bruschi, Degradation of transferulic an *p*-coumaric acid by *Acinetobacter calcoaceticus* DSM 586, *Biochim Biophys. Acta*, 1244 (1995) 363-367.
- [21] J.F. Cavin, L. Barthelmebs y C. Divies, Molecular characterization of an inducible *p*-coumaric acid decarboxylase from *Lactobacillus plantarum*: gene cloning, transcriptional analysis, overexpression in *Escherichia coli*, purification, and characterization, *Appl. Environ. Microbiol.*, 63 (1997) 1939-1944.
- [22] J.F. Cavin, V. Dartois y C. Divies, Gene cloning, transcriptional analysis, purification, and characterization of phenolic acid decarboxylase from *Bacillus subtilis*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 64 (1998) 1466-1471.
- [23] M.J. Gasson, Y. Kitamura, W.R. McLauchlan, A. Narbad, A.J. Parr, E.L.H. Parsons, J. Payne y M.J.C. Rhodes, Metabolism of ferulic acid to vanillin: a bacterial gene of the enoyl-SCoA hydratase/isomerase superfamily encodes an enzyme for the hydration and cleavage of a hydromycinnamic acid SCoA thioester, *J. Biol. Chem.*, 273 (1998) 4163-4170.
- [24] E. Dorn, M. Hellwig, W. Reineke y H.J. Knackmuss, Isolation and characterization of a 3-chlorobenzoate degrading *Pseudomonas*. *Arch. Microbiol.*, 99 (1974) 61-70.

RECOMENDACIONES A LOS AUTORES DE ARTICULOS

La revista *Tecnología del Agua* tiene como objetivo esencial la divulgación e intercomunicación entre todas aquellas personas y entidades vinculadas al mundo del agua. Por lo tanto, en la presentación de los trabajos es necesario tener en cuenta

un conjunto de exigencias habituales en el periodismo científico-técnico relacionadas con la forma y el contenido de esos artículos. A continuación relacionamos algunas normas con el fin de facilitar la publicación de los artículos.

1. El título, con el correspondiente subtítulo, no debe sobrepasar en total los 100 espacios.
2. Deberán figurar el nombre y dos apellidos del autor o autores, su titulación y/o cargo en el organismo o empresa al que pertenezcan, dirección completa, teléfono de contacto, fax, e-mail y web.
3. Al inicio del artículo se incluirá un breve resumen de no más de 100 palabras en castellano y su traducción, junto con la del título y subtítulo, en inglés. También las palabras claves (de 5 a 10) del artículo y su traducción en inglés.
4. El texto seguirá una línea de explicación coherente y progresiva, contando de partes con subtítulos enumerados, que habitualmente empiezan con una introducción al tema para pasar a su estudio pormenorizado, terminando con las conclusiones, a modo del resultado, del estudio. Finalmente se relacionará la bibliografía o aquellos textos cuya lectura se recomienda.
5. El artículo se redactará evitando el lenguaje académico o excesivamente denso, sin por ello dejar de mantener un rigor conceptual, explicando cuando convenga aquellos términos o conceptos de uso poco habitual.
6. Preferentemente se utilizarán frases y párrafos cortos. También se evitará en lo posible la inclusión de notas a pie de página, incorporándolas dentro del texto.
7. Se cuidará la correcta expresión de las unidades, símbolos y abreviaciones.
8. El texto tendrá una extensión de unas 5-15 hojas, formato DIN A4, mecanografiadas a doble espacio.
9. Preferentemente se incluirán gráficos, esquemas, dibujos o fotografías en color para facilitar la comprensión del texto, procurando que tengan suficiente calidad gráfica para su reproducción directa. Cada figura llevará su número y pie explicativo. Si las fotografías y gráficos son enviados por e-mail, disquette, CD-Rom..., deben tener un mínimo de 300 ppp (píxeles por pulgada) de resolución y en formato .jpg, .tiff o .bmp, preferentemente.
10. El artículo debe remitirse sobre papel, soporte informático (CD-Rom, disco óptico, disquette, zip, etc.) escrito en Word, Wordperfect o compatibles, o e-mail. Se agradecerá que las gráficas también se graben independientemente del texto, además de incluirse en el archivo de texto. Los artículos deberán dirigirse al Director Técnico o Jefe de Redacción de la revista *Tecnología del Agua*, a la dirección o correo electrónico siguiente:

 **Reed Business Information**

Dtor. de la revista
Tecnología del Agua
Entença, 28 entl.
08015 Barcelona España
E-mail: r.vinagre@rbi.es