

Efecto de surfactantes nonilfenol etoxilados sobre la estructura de la comunidad microbiana en plantas de tratamientos de efluentes

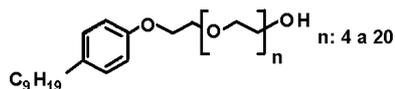
Itria, R. F. ⁽ⁱ⁾; Lozada, M. ⁽ⁱⁱ⁾; de Tullio, L. A. ⁽ⁱ⁾; Erijman, L. ⁽ⁱⁱ⁾

⁽ⁱ⁾ Centro de Investigaciones en Ingeniería Ambiental (CIIA)

⁽ⁱⁱ⁾ Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular (INGEBI-CONICET)

INTRODUCCIÓN

Los nonilfenol polietoxilados (NPEO) son surfactantes de amplio uso en procesos industriales. Se utilizan comercialmente como mezclas complejas de isómeros, con una variedad de configuraciones en la cadena hidrocarbonada.



La degradación bacteriana lleva a la eliminación secuencial con formación de compuestos con uno (NPEO₁) y dos (NPEO₂) grupos etoxi, sus análogos ácidos carboxílicos y nonil fenol (NP). Estos compuestos son más tóxicos y recalcitrantes que los compuestos originales, y se acumulan en ambientes acuáticos, donde representan un riesgo sanitario a través de efectos estrogénicos demostrados en peces, aves y mamíferos^[1].

OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es la disección de los aspectos microbiológicos de la degradación de los NPEO y sus intermediarios. Estos conocimientos serán aplicados al diseño y operación de sistemas de tratamiento de efluentes industriales líquidos.

MODELO EXPERIMENTAL

El modelo a escala de laboratorio usado fue construido y operado de acuerdo a las normas estandarizadas para sistemas semi-continuos de barros activados ISO 9887:1992 (SCAS). Consiste en cuatro unidades con una capacidad de 3 litros de barros activados cada una (ver Fig. 1). La alimentación se realiza en forma periódica con medio sintético esterilizado. Dos de los reactores (SCAS₁ y SCAS₃) re-

ciben adicionalmente una concentración de 0.2% de NPEO. En cada ciclo la aireación se detiene 60 min para permitir la sedimentación del lodo y 2 litros de sobrenadante clarificado son removidos por vía de una bomba peristáltica (Fig. 1). El sistema se opera bajo una temperatura de 20°C.

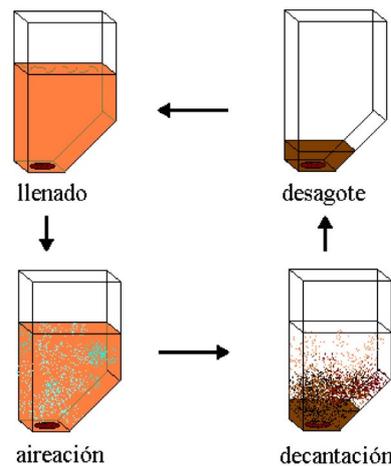


Fig. 1: Esquema de funcionamiento de reactor semicontinuo de tratamiento (SCAS) según norma ISO 9887

Tabla I: Parámetros de control de sistemas experimentales de tratamiento

Parámetro	NPEO		Control	
	SCAS ₁	SCAS ₃	SCAS ₂	SCAS ₄
SRT (d)	44	42	50	52
DOO _{entrada}	230	230	120	120
DBO _{entrada}	110	110	72	72
SSLM mg/l	2030	2000	2300	2410
OD (mg/l)	7,8	7,8	7,8	7,8
F/M	0,02	0,02	0,01	0,01
IVL (ml/g)	16	16	92	80

MATERIALES Y MÉTODOS

Extracción de ácidos nucleicos. Las células fueron lisadas con un agitador recíproco a alta velocidad en presencia de perlas de sílice-óxido de zirconio (100 μ m). El ADN fue purificado con CTAB, fenol y cloroformo y precipitado con isopropanol y acetato de sodio. El ARN fue extraído con fenol a pH = 5,1.

PCR-DGGE. Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación corresponden a secuencias conservadas en la subunidad 16S del ARN ribosomal de bacterias, dando lugar a segmentos de aprox. 200 pb de longitud. Los productos de PCR fueron separados en función a las diferentes sensibilidades a la desnaturalización química en una electroforesis en poliacrilamida conteniendo un gradiente entre 20 y 60% de desnaturalizante (100% es 7M urea y 40% formamida)[2]. Las bandas dominantes del DGGE en los sistemas perturbados con NPEOx, que están ausentes en el control, fueron extraídas del gel, reamplificadas, clonadas y secuenciadas.

Hibridación in situ fluorescente (FISH). Se realizó a 46°C en cámara húmeda en buffer de hibridación conteniendo 50 nM del correspondiente oligonucleótido marcado con cy3 o FITC[3]. Las muestras hibridadas fueron incubadas con DAPI para la tinción de ADN total.

RESULTADOS

La observación microscópica de las muestras de SCAS reveló que el agregado de surfactante produce un cambio significativo en la estructura del floc bacteriano, reduciendo el número de bacterias filamentosas, identificadas como *Microthrix parvicella*, obteniéndose flocs más compactos y de rápida sedimentación (ver tabla I). El estudio cinético de las tasas de eliminación de DBO y DQO muestra el carácter recalcitrante de los productos de degradación primaria del NPEO.

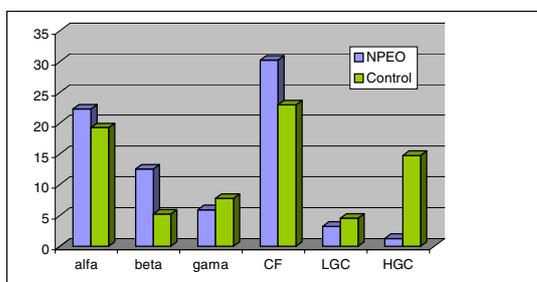


Fig. 2: Hibridación dot-blot de muestras de reactor alimentado con NPEO y control

La hibridación dot-blot muestra un aumento significativo en la proporción de bacterias pertenecientes al subgrupo β de las Proteobacterias y la desaparición casi completa de bacterias gram positivas con alto contenido en G+C en los sistemas que recibieron NPEO (ver Fig. 2)^[4]. Las diferencias observadas fueron confirmadas *in situ* mediante la utilización de sondas fluorescentes específicas (ver Fig. 3).

A partir de la comparación con bases de datos de secuencias nucleotídicas de ARNr se determinó la predominancia de una especie relacionada con el género *Acidobacterium*, cuyos miembros no son cultivables.

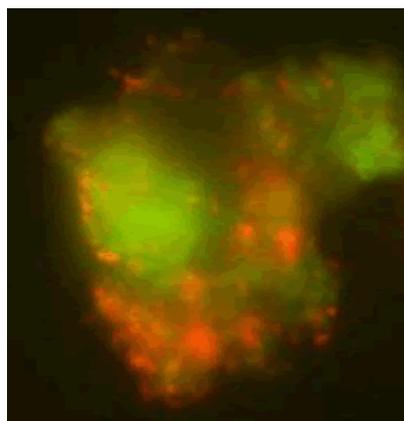


Fig. 3: Hibridación in situ fluorescente de muestra de reactor alimentado con NPEO con sonda para β -proteobacteria (en rojo) y contratinción con DAPI

CONCLUSIONES

Se presentan nuevas técnicas moleculares de alta resolución para el análisis de microorganismos en sistemas complejos. La comprensión del metabolismo bacteriano de NPEO posibilita la búsqueda de condiciones ambientales funcionalmente óptimas para su completa biodegradación.

REFERENCIAS

- [1] R. C. Hale, C. L. Smith, P. O. de Fur, E. Harvey, E. O. Bush, "Nonylphenols in sediments and effluents associated with diverse wastewater outfalls" (2000) Environmental Toxicology & Chemistry 19 pp. 946-952.
- [2] C. Casserly, L. Erijman, "Molecular monitoring of microbial diversity in an UASB reactor" (2002) International Biodegradation and Biodeterioration. En prensa.
- [3] R. Amann, B.M Fuchs, S. Behrens, "The Identification of Microorganisms by Fluorescence in situ Hybridization" Current Opinion in Biotechnology (2001), 12, pp 231-236.
- [4] R. F. Itria, M. Lozada, L. A. de Tullio, L. Erijman. "Microbial Community Analysis of Ethoxylated Nonyl phenol-degrading Microcosms and Activated Sludge Systems" Biocell (2001) Vol. 25, Suppl 25, P099, p 66.

Para mayor información contactarse con:

Dr. Leonardo Erijman - erijman@dna.uba.ar
Lic. Raúl Itria - rfitria@inti.gov.ar

[Volver a página principal](#) ◀