

# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA



Casa abierta al tiempo

## ESTUDIO FISIOLÓGICO Y POBLACIONAL DE LA METANOGÉNESIS DEL 2- CLOROFENOL (2CP) EN UN REACTOR ANAEROBIO DE LOTE SECUENCIADO (ASBR)

### TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

*M.B. Lizeth Maribel Beristain Montiel*

COMITE TUTORIAL

Directora: *Dra. Florina Ramírez Vives*

Asesores: *Dra. Flor de Ma. Cuervo López*

*Dr. Germán Buitrón Méndez*

México D.F a 14 de diciembre de 2011.

El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACyT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo.

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Microbiología Ambiental y Tratamiento de Aguas Residuales del Departamento de Biotecnología y en el Laboratorio Divisional de Biología Molecular de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa. Gracias a la beca otorgada por el CONACyT, así como al apoyo financiero recibido a través del proyecto: **SEP-CONACYT CB-2005-C01-49748-Z.**

---

Mexico D.F a 14 de Diciembre de 2011

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la  
Unidad Iztapalapa aprobó la Tesis

**ESTUDIO FISIOLÓGICO Y POBLACIONAL DE LA METANOGÉNESIS DEL  
2-CLOROFENOL (2CP) EN UN REACTOR ANAEROBIO DE LOTE SECUENCIADO (ASBR)**

Que presentó

**Lizeth Maribel Beristain Montiel**

**Comité Tutorial:**

Director: Dra. Florina Ramírez Vives

Asesora: Dra. Flor de María Cuervo López

Asesor: Dr. Germán Buitrón Méndez

**Jurado:**

Presidente: Dr. Sergio Huerta Ochoa

Secretaria: Dra. Anne Claire Texier Valentin

Vocal: Dra. Flor de María Cuervo López

Vocal: Dr. Sergio Martínez Hernández



Texier



*"...lo asustó la sospecha tardía de que es la vida,  
más que la muerte, la que no tiene límites."*

---

## **Agradecimientos.**

Mis agradecimientos más sinceros a mi directora de tesis, Dra. Florina Ramírez Vives, por su apoyo incondicional durante todos estos años

A la Dra. Flor de Maria Cuervo, por inculcarme siempre un pensamiento crítico y ser parte fundamental en la realización de esta tesis.

A los miembros del jurado por sus pertinentes y acertados comentarios para mejorar esta tesis. En especial, a la Dra. Anne Claire Texier, Dr. Germán Buitron, y al Dr. Sergio Martinez Hernandez.

A mi compañero, cómplice y mejor amigo Roberto por su amor, por su paciencia y por alentarme a seguir adelante en los momentos difíciles.

A mis Papás y hermanas por haber creído en mí y apoyarme en cada momento de mi vida.

A mis compañeros y amigos del laboratorio por sus consejos y apoyo en las jornadas de trabajo.

---

# **CONTENIDO**

<b>Resumen</b>	I
<b>Abstract</b>	III
<b>Panorama general</b>	1
<b>Capítulo 1. Revisión bibliográfica</b>	
1.1 Eliminación biológica del carbono	3
1.2 Digestión anaerobia	3
1.3 Compuestos aromáticos clorados	6
1.3.1 2-Clorofenol (2CP)	8
1.3.1.1 Propiedades del 2CP	8
1.3.1.2 Efectos nocivos del 2-Clorofenol (2CP)	9
1.3.2 Eliminación biológica de clorofenoles	9
1.3.2.1 Eliminación biológica de clorofenoles en condiciones aerobias	10
1.3.2.2 Eliminación biológica de clorofenoles en condiciones anaerobias	12
1.3.2.2.1 Deshalogenación reductiva	12
1.3.2.2.2 Ruta metabólica de la digestión anaerobia del 2CP	14
1.3.2.2.3 Sistemas de tratamiento anaerobios metanogénicos	15
1.3.2.3 Eliminación de clorofenoles en sistemas aerobios-anaerobios	19
1.4 Dinámica de Poblaciones	20
1.4.1 Estudio de comunidades microbianas en reactores anaerobios	22
1.5 Referencias	24
<b>Capítulo 2. Justificación y objetivos</b>	
2.1 Justificación	33
2.2 Objetivos	34
2.2.1 Objetivo general	34
2.2.2 Objetivo particular	34
<b>Capítulo 3. Materiales y métodos</b>	
3.1 Materiales	35
3.1.1. Reactor continuo y fuente de inóculo	35
3.1.2 Cultivos en lote	36
3.1.2.1 Evaluación de contacto previo al 2CP	36
3.1.2.2 Donadores de electrones	36
3.1.2.3 Adición de oxígeno	37

3.1.3	Ensayos cinéticos en reactores anaerobios de lote secuenciado (ASBR).	37
3.1.3.1	Pruebas abióticas de volatilidad y adsorción con el 2CP en el ASBR	38
3.2	Métodos analíticos	38
3.2.1	Cuantificación de 2CP y fenol	38
3.2.2	Determinación de biogás	39
3.2.3	Determinación de carbono total y carbono inorgánico por TOC.	40
3.2.4	Determinación de ácidos grasos volátiles (AGV)	40
3.2.5	Índice volumétrico del lodo (IVL)	41
3.2.6	Extracción de sustancias exopoliméricas (SEP)	42
3.2.6.1	Cuantificación de carbohidratos y proteínas	42
3.3	Métodos moleculares	43
3.3.1	Extracción del DNA y amplificación del gen 16S r DNA	43
3.3.2	Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE)	44
3.3.3	Purificación y secuenciación de las bandas de 16S rDNA	44
3.4	Cálculo de índices ecológicos	45
3.5	Cálculo de variables de respuesta	45
3.6	Referencias	47
<b>Capítulo 4.</b>	<b>Metanización y mineralización del 2-clorofenol en cultivos en lote por digestión anaerobia</b>	<b>49</b>
<b>Capítulo 5.</b>	<b>Biodegradación del 2-Clorofenol (2CP) en un reactor anaerobio de lote secuenciado (ASBR)</b>	<b>59</b>
<b>Capítulo 6.</b>	<b>Efecto de la concentración del 2-Clorofenol (2CP) en la dinámica poblacional en un reactor anaerobio de lote secuenciado (ASBR)</b>	<b>69</b>
<b>Capítulo 7.</b>	<b>Conclusiones generales y recomendaciones.</b>	
7.1	Conclusiones generales.	90
7.2	Recomendaciones	92
<b>Capítulo 8.</b>	<b>Anexos</b>	<b>93</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

**Capítulo 1.**

	Etapas metabólicas de la digestión anaerobia. Bacterias (1) hidrolíticas-acidogénicas, (2) homoacetogénicas, (3) Acetogénicas, (4) metanogénicas hidrogenófilas, (5) metanogénicas acetoclásticas	6
Fig. 1.1	Ciclo de los halógenos. Los microorganismos son responsables de gran manera del rompimiento de los compuestos en el ambiente introducidos de fuentes biogénica, geogénica o antropogénica.	7
Fig. 1.2	Ruta de degradación aerobia.	10
Fig. 1.3	Esquema de la Deshalorespiración.	12
Fig. 1.4	Utilización del 3-Clorobenzoato como aceptor de electrones	13
Fig. 1.5	Ruta metabólica de la digestión anaerobia del 2CP.	15
Fig. 1.6	Ciclos de operación de un reactor de lote secuenciado (SBR)	18

**Capítulo 4.**

Fig. 4.1A	2CP consumption, with no acetate (○), with acetate (Δ), phenol (◇) as electron donor and acetate consumption (X).	54
Fig. 4.1B	Phenol formation and consumption, with no acetate (○), with acetate (Δ), with phenol (◇).	54
Fig. 4.2	Phenol production at four different oxygen concentrations without previous contact to 2CP.	55

**Capítulo 5.**

Fig. 5.1	Profile of 2CP consumption, phenol, and biogas production (a) with $84 \pm 5$ mg 2CP-C/ L as sole carbon and energy source (cycle 16), (b) with $84 \pm 5$ mg 2CP-C/ L and $84 \pm 4$ mg C-phenol/L as the electron donor (cycle 16), (c) with $196 \pm 5$ mg 2CP-C/ L as the sole source of carbon and energy (cycle 28), (d) with $196 \pm 9$ mg 2CP-C/ L and $196 \pm 8$ mg C-phenol/L as the electron donor (cycle 28).	64
Fig. 5.2	a) Profile of 2CP specific consumption rates obtained at different substrate concentration along the operational cycles. (b) Adjusting of the experimental data with the modified model of Han and Levenspiel, $q_{2CP}$ in both reactors versus different initial concentrations. (●) ASBR <sub>A</sub> and (○) ASBR <sub>B</sub> .	65
Fig. 5.3	(a) Sludge volume index profile in ASBR <sub>A</sub> (■) and ASBR <sub>B</sub> (■) reactors. Exopolimeric substances profiles at the different 2CP concentrations, (b) Carbohydrate exopolymeric and (c) Protein exopolymeric. (●) ASBR <sub>A</sub> and (○) ASBR <sub>B</sub> .	66

**Capítulo 6.**

Fig. 6.1	DGGE profiles of 16S rDNA amplicons in respiratory steady state. Bacteria (I) ASBR <sub>A</sub> , (II) ASBR <sub>B</sub> . Archaeal (III) ASBR <sub>A</sub> , (IV) ASBR <sub>B</sub> . Phylogenetic tree of the main bacteria present in both ASBR, (b)	78
Fig. 6.2	Phylogenetic tree of the main Archaea. Phylogenetic trees were generated based on the neighbor-joining method of the sequences of	82

16S rRNA-DGGE and taking as reference sequences from the databases.

Fig. 6.3 Mass balance at 196 mg C-2CP/L (cycle 27) in both reactors. 84

## ÍNDICE DE TABLAS

### Capítulo 1.

Tabla 1.1	Propiedades fisicoquímicas del 2-CP.	9
Tabla 1.2	Ejemplos de sistemas aerobios para el tratamiento monoclorofenoles.	11
Tabla 1.3	Microorganismos aislados en presencia de compuestos clorados.	14

### Capítulo 3.

Tabla 3.1	Concentraciones de 2CP y Fenol utilizadas en los reactores ASBR.	38
Tabla 3.2	Parámetros de curvas estándar de 2CP y fenol.	39
Tabla 3.3	Parámetros de curvas estándar de CH <sub>4</sub> y CO <sub>2</sub> .	40
Tabla 3.4	Parámetros de curvas estándar de CT y CI.	40
Tabla 3.5	Parámetros de curvas estándar de AGV.	41
Tabla 3.6	Parámetros de curvas estándar de carbohidratos y proteínas.	42

### Capítulo 4.

Tabla 4.1	Consumption efficiencies and methane production yields at different concentrations of 2CP in both ASBR <sub>A</sub> and ASBR <sub>B</sub> .	54
Tabla 4.2	Specific consumption rate, efficiency and yield values with acetate or phenol as electron donors.	55
Tabla 4.3	Specific consumption rate, efficiency and yield values obtained at different oxygen concentrations when using sludge without exposure to 2CP and oxygen and with 80 days of previous contact time to 2CP and oxygen.	56
Tabla 4.4	Phenol formation at four different oxygen concentrations	56
Tabla 4.5	Mass balance in presence of different oxygen concentrations.	57

### Capítulo 5.

Tabla 5.1	Consumption efficiencies and methane production yields at different concentrations of 2CP in both ASBR <sub>A</sub> and ASBR <sub>B</sub>	64
-----------	---	----

### Capítulo 6.

Tabla 6.1	Species richness (S), structural diversity (H), and evenness (J) indices of microbial community in both ASBR.	76
Table 6.2	Identification of nucleotide sequences analyzed from DGGE bands at all the concentrations tested in both ASBR reactors. Identification of nucleotide. Presence (+) and absence (-) of bands of Bacteria and Archaea.	81

Specific consumption rate of 2CP, consumption efficiency and  
Tabla 6.3 biogas production yield in the ASBR<sub>A</sub> (with 2CP) and ASBR<sub>B</sub> (with 83  
2CP and Phenol) reactors at each concentration tested.

## RESUMEN

El presente trabajo pretende contribuir al estudio de la eliminación del 2-clorofenol (2CP) bajo condiciones anaerobias metanogénicas, así como al entendimiento de las interacciones entre las respuestas fisiológicas dentro de un consorcio anaerobio metanogénico y la estructura de la comunidad microbiana presente. El trabajo se dividió en tres partes. En la primera se evaluó en cultivos en lote i) el efecto de utilizar como inóculo lodo metanogénico con diferentes periodos de contacto previo al 2CP, ii) la adición de acetato y fenol como donador de electrones en relación estequiométrica con el 2CP, iii) el efecto de la presencia de diferentes concentraciones iniciales de oxígeno. La segunda parte se enfocó en el estudio del proceso respiratorio metanogénico del 2CP y en las características de sedimentación del lodo en dos reactores anaerobios de lote secuenciado (ASBR). En la tercera parte se evaluó la relación del proceso respiratorio del 2CP y la estructura molecular de las comunidades microbianas de arqueas y bacterias presentes en los cultivos mediante separación de DNA por electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE).

En los cultivos en lote, se observó la reducción en la fase de retardo de hasta el 62.5% con un concomitante incremento del 114% en la velocidad específica de consumo ( $q_{2CP}$ ) al utilizar como inóculo un lodo con un tiempo de contacto previo al 2CP de 80 días. Cuando se evaluó el efecto de la adición de un donador de electrones se encontró que la utilización de acetato no favoreció el consumo del 2CP, en contraste, la adición de fenol resultó en un incremento del 46% en la velocidad específica de consumo de 2CP. No se observaron diferencias significativas durante la evaluación de la adición de diferentes concentraciones de oxígeno en las velocidades específicas de consumo y eficiencias de consumo de 2CP. Sin embargo, cuando el inóculo utilizado fue un lodo con 80 días de contacto previo al 2CP y oxígeno, se observaron incrementos de hasta el 73% en las  $q_{2CP}$ . De lo anterior se infiere que el incremento en la  $q_{2CP}$  pudo ser resultado del contacto previo al 2CP más que a la adición de oxígeno. Por lo tanto, este apartado muestra evidencias de que la utilización de lodos con tiempo de contacto previo al compuesto aromático puede ser un parámetro clave para mejorar las velocidades específicas de consumo del 2CP.

Se operaron dos reactores anaerobios de lote secuenciado (ASBR). El reactor ASBR<sub>A</sub> fue alimentado con 2CP como única fuente de carbono y energía, mientras que el reactor ASBR<sub>B</sub> fue alimentado con una mezcla de 2CP y fenol como donador de electrones. Se evaluaron las siguientes concentraciones de 2CP (mg C/L): 28, 42, 56, 84, 112, 140 y 196 en ambos reactores. En el reactor ASBR<sub>B</sub> se evaluaron las siguientes concentraciones de fenol (mg C/L): 28, 42, 56, 84, 112, 140 y 196. Ambos reactores presentaron un comportamiento similar en el consumo del 2CP así como en los valores de las variables de respuesta. Las eficiencias de consumo ( $90\pm 0.4\%$ ) fueron constantes en todas las concentraciones evaluadas. Las velocidades específicas de consumo presentaron un incremento de cinco veces al utilizar las concentraciones experimentales de 28 a 112 mg C-2CP/L, en contraste, al evaluar 140 y 196 mg C-2CP/L se presentó el decremento del 37% y 72% respectivamente. Los rendimientos de producción de biogás ( $Y_{biogas-C2CP-C} = 0.8\pm 0.04$ ) fueron constantes de 28 mg C-2CP/L a 140 mg C-2CP/L, sin embargo al utilizar 196 mg C-2CP/L se observó un decremento en los valores del  $78\pm 3\%$  en ambos reactores. La disminución en los

rendimientos podría estar asociada a la acumulación de ácidos grasos volátiles (AGV) la cual únicamente se presentó a la última concentración. Se obtuvieron valores de IVL entre 35 y  $105 \pm 5$  mL/g, en todas las concentraciones evaluadas en el reactor ASBR<sub>A</sub>, estos valores reflejan la buena capacidad de sedimentación del lodo. El reactor ASBR<sub>B</sub> tuvo el mismo comportamiento sin embargo, cuando se aumentó la concentración a 140 y 196 mg C-2CP/L se observó un incremento significativo en los valores del IVL, provocando problemas en la sedimentabilidad del lodo. Los resultados obtenidos en este apartado dan evidencia de que el utilizar un reactor ASBBR puede ser una atractiva herramienta para el tratamiento de compuestos aromáticos debido a que el periodo de aclimatación necesario es corto. Además se encontró que el consumo del 2CP puede llevarse a cabo satisfactoriamente sin la adición de un donador de electrones, aunado a esto un reactor ASBR puede ser utilizado satisfactoriamente para el tratamiento de hasta 280 mg C-compuesto aromático/L.

El análisis de las secuencias del gen 16S DNAr de ambos reactores, mostró la presencia de bacterias asociadas con *P. putida*, *P. mendocina*, *U. Caulobacter*, *R. lindaniclasticus* y *Uncultured Chloroflexi bacterium* durante la operación de ambos reactores. Se sugiere que la presencia y permanencia de algunas de estas bacterias puede estar relacionada con la deshalogenación del 2CP así como con el consumo de intermediarios producidos. Las altas  $E_{2CP}$  en todas las concentraciones evaluadas pueden estar relacionadas con el equilibrio en las poblaciones microbianas presentes en ambos reactores reflejado en el índice  $J = 0.97 \pm 0.2$ . Por otro lado el decremento en las  $q_{2CP}$  puede estar asociado con el decremento en las poblaciones reflejado en el índice ecológico S. La acumulación de fenol y AGV observada puede estar asociada con la ausencia de bandas relacionadas con *Caulobacter* y *Bacillus*. La disminución en los rendimientos de producción de biogás mencionada anteriormente, puede estar asociada con (i) la disminución o ausencia de bacterias fermentativas o acetogénicas, (ii) la ausencia de sustratos necesarios para la metanogénesis, y (iii) la eventual disminución de las poblaciones metanogénicas reflejados en los índices S y J.

## ABSTRACT

This work aims to contribute to the study of the elimination of 2-chlorophenol (2CP) under anaerobic methanogenic conditions, as well as the understanding of the interactions between physiological responses in a methanogenic consortium and the structure of the microbial community present. The work was divided into three parts. The first was focused on evaluating in batch cultures the effect of: (i) the use of sludge with different periods of previous contact to 2CP, (ii) the electron donor addition in stoichiometric relation with 2CP and (iii) the presence of different initial oxygen concentrations. The second part was focused on the study of the respiratory process of 2CP and settling characteristics of sludge in two sequencing batch anaerobic reactors (ASBR). In the third part was assessed the relationship of the respiratory process of 2CP and molecular structure of microbial communities of archaea and bacteria in the cultures by electrophoresis in denaturing gradient gel (DGGE).

In batch cultures, when compared with the control, 50 and 80 days of previous contact to 2CP resulted in a lag phase reduction of 57% and an increased in 2CP specific consumption rate ( $q_{2CP}$ ) of 114%. When we evaluated the effect of the addition of an electron donor was found that the use of acetate did not favor the consumption of 2CP, in contrast, the phenol addition resulted in a 46% increase in the specific rate of consumption of 2CP. No significant differences were observed during the evaluation of the addition of different concentrations of oxygen in the specific consumption rates and efficiencies of 2CP consumption. However, when the inoculum used was sludge with 80 days of contact prior to 2CP and oxygen, were observed increases up to 73% in  $q_{2CP}$ . Thus, the increase in  $q_{2CP}$  values obtained might be due to the sludge exposure to 2CP rather than oxygen addition. Therefore, the use of sludge with a previous contact to 2CP resulted to be a key parameter for enhancing 2CP specific consumption rate.

Two reactors were set up (ASBR<sub>A</sub> and ASBR<sub>B</sub>). The ASBR<sub>A</sub> was fed with 2CP as the sole source of carbon and energy, while the ASBR<sub>B</sub> reactor was fed with a mixture of 2CP and phenol as electron donor. Were assessed the following 2CP concentrations (mg C/L): 28, 42, 56, 84, 112, 140 and 196 in both reactors. In the ASBR<sub>B</sub> were evaluated the following phenol concentrations (mg C/L): 28, 42, 56, 84, 112, 140 and 196. Both reactors showed a similar behavior in the 2CP consumption and in the values of the response variables. Consumption efficiencies ( $90 \pm 0.4\%$ ) were constant at all concentrations tested. The specific consumption rates showed an increase of five times when were assessed the experimental concentrations of 28 to 112 mg 2CP-C/L. In contrast, when were evaluated experimental concentrations of 140 and 196 mg C-2CP / L was presented a decrease of 37% and 72% respectively. The biogas yields ( $Y_{biogas-C/2CP-C} = 0.8 \pm 0.04$ ) were constant from 28 mg 2CP-C/L to 140 mg 2CP-C/L, however when was assessing 196 mg 2CP-C/L was observed a decrease of  $78 \pm 3\%$  in biogas yields in both reactors. The decrease in biogas yields could be associated with the accumulation of volatile fatty acids (VFA), which is only presented to the last concentration. SVI values between 35 and  $105 \pm 5$  mL/g were obtained at all concentrations tested in the reactor ASBR<sub>A</sub>, these values reflect the good settling characteristics of sludge. However, sludge flotation was observed in ASBR<sub>B</sub> reactor when 140 mg 2CP-C/L and 196 mg 2CP-C/L were

assayed. At these conditions SVI values were  $\geq 135 \pm 5$  mL/g. The use of an ASBR reactor can be an attractive tool for the treatment of aromatic compounds due to the sludge acclimation period is shorter. The 2CP consumption can also be carried out without the addition of an electron donor. This type of reactor could be successfully used for the treatment of up to 140 mg C-2CP compound/L and 140 mg C-fenol/L.

Analysis of the 16S rDNA gene sequences of both reactors showed the presence of bacteria associated with *P. putida*, *P. Mendocina*, *U. Caulobacter*, *Uncultured bacterium Cloroflexi* and *R. lindaniclasticus* during the operation of both reactors. It may suggest that the presence and permanence of some of these bacteria may be related to the dehalogenation of 2CP as well as intermediate consumption produced. The high consumption efficiency (90%), at all concentration tested may be related with the evenness of microbial populations (J index =  $0.97 \pm 0.2$ ) present in both reactors. On the other hand, the decrease in the  $q_{2CP}$  may be associated with the decrease in population reflected in the ecological index S. The accumulation of phenol and VFA observed at 196 mg 2CP-C/L, could be linked to the absence of bands related to *Caulobacter* and *Bacillus*. The decrease in biogas production yields mentioned above, might be linked with (i) the absence of fermentative or acetogenic bacteria, (ii) the absence of substrates for conducting methanogenesis and (iii) the eventually declination of methanogenic populations (decrease of S and J indices).

## PANORAMA GENERAL

A medida que aumenta el poder del humano sobre la naturaleza y aparecen nuevas necesidades como consecuencia de la vida en sociedad, el medio ambiente que lo rodea se deteriora cada vez más. El comportamiento social del humano, que lo condujo a comunicarse mediante el lenguaje y formar la cultura humana, le permitió diferenciarse de los demás seres vivos. Pero mientras ellos se han adaptado al medio ambiente para sobrevivir, el humano lo adapta y modifica según sus necesidades.

El progreso tecnológico, por una parte y el acelerado crecimiento demográfico, por la otra, producen la alteración del medio, llegando en algunos casos a atentar contra el equilibrio biológico de la Tierra. No es que exista una incompatibilidad absoluta entre el desarrollo tecnológico, el avance de la civilización y el mantenimiento del equilibrio ecológico, pero es importante que el hombre sepa armonizarlos. Para ello es necesario que proteja los recursos renovables y no renovables y que tome conciencia de que el saneamiento del ambiente es fundamental para la vida sobre el planeta.

La contaminación del agua es uno de los problemas ambientales más importantes que surge como resultado de la adición de cualquier sustancia al ambiente, en cantidad tal que cause un desequilibrio. La contaminación puede surgir a partir de ciertas manifestaciones de la naturaleza (fuentes naturales) o bien debido a los diferentes procesos productivos del hombre (fuentes antropogénicas) que conforman las actividades de la vida diaria. Las aguas residuales industriales representan, sin embargo, uno de los mayores problemas de contaminación antropogénica. Las cuatro principales industrias contaminantes en México son: celulosa, papel, textil y química, las cuales afectan principalmente a bosques, aire y agua (CONAGUA, 2009).

En México las aguas residuales en su mayoría no reciben tratamiento. Este hecho, además de afectar el ambiente, incrementa los costos del agua por los tratamientos a los que debe ser sometida para utilizarse. Conocer la situación de la calidad del agua en México implica identificar el grado de contaminación de los cuerpos de agua y las causas de ésta.

En este contexto, los sistemas de tratamiento de aguas residuales son por esencia la herramienta fundamental que puede ser utilizada dentro de las acciones para controlar la contaminación del agua. A través de ellos se mejora la calidad de las mismas propiciando la posibilidad de su reuso y, se protege la ecología de los cuerpos receptores y la salud pública. Tal solución representa, por una parte, cuantiosas inversiones, y por otra, la necesidad de formar recursos humanos altamente capacitados que propongan y apliquen acciones correctivas que conlleven a la protección del medio en estudio.

### *Formato de la tesis*

Este trabajo pretende contribuir a un mejor entendimiento del proceso respiratorio metanogénico de 2-clorofenol (2CP) y su relación con la dinámica poblacional del cultivo.

Esta tesis está dividida en siete Capítulos. En cada uno de ellos se hace un resumen del contenido. Al final de cada uno se presentan las conclusiones particulares de cada capítulo así como sus referencias. En el Capítulo 1 se presenta una revisión bibliográfica sobre la digestión anaerobia del 2CP y la dinámica de poblaciones microbianas. En el Capítulo 2 se hace una justificación y se definen los objetivos del trabajo. En el Capítulo 3 se indican los materiales y métodos analíticos utilizados durante trabajo experimental. En el Capítulo 4 se hace un análisis de la metanización y mineralización del 2-clorofenol (2CP) en cultivos en lote por digestión anaerobia. En el Capítulo 5 se presentan resultados sobre la biodegradación del 2-clorofenol (2CP) en un reactor anaerobio de lote secuenciado (ASBR). En el Capítulo 6 se realiza un análisis acerca del efecto de la concentración de 2-Clorofenol (2CP) en la dinámica poblacional en un reactor anaerobio de lote secuenciado (ASBR). En el Capítulo 7 se presentan las conclusiones generales, las recomendaciones y perspectivas de este trabajo.

# 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

## 1.1. Eliminación biológica del carbono

La eliminación de carbono es el tratamiento más importante en depuración biológica de aguas residuales. El proceso de utilización de la materia orgánica puede resumirse como la transformación de un compuesto por un conjunto de microorganismos a través de sus diferentes rutas metabólicas. Los microorganismos utilizan el carbono por dos vías fundamentales: la vía desasimilatoria (reacciones de producción de energía) y la vía asimilatoria (reacciones de síntesis).

Existen tres vías desasimilatorias fundamentales por las que se obtiene energía a partir de compuestos carbonados: la respiración aerobia, la respiración anaerobia y la fermentación. Las dos vías respiratorias implican la oxidación del carbono del compuesto orgánico hasta H<sub>2</sub>O y diversos gases. Desde el punto de vista energético, las vías respiratorias son más eficaces que la fermentación, al obtener más cantidad de energía por molécula de sustrato original.

En la respiración aerobia, el oxígeno actúa como aceptor de electrones y utiliza moléculas de carbono con la finalidad de producir CO<sub>2</sub>, agua y energía en forma de ATP. En la respiración anaerobia se utilizan diferentes aceptores de electrones como: nitrato, sulfato, CO<sub>2</sub>, entre otros, con la finalidad de producir compuestos reducidos de nitrógeno, azufre, carbono, etc. y energía en forma de ATP. En la fermentación el aceptor final de electrones del NADH producido en la glucólisis no es el oxígeno, sino un compuesto orgánico que se reducirá para poder reoxidar el NADH a NAD<sup>+</sup>. El compuesto orgánico que se reduce es un derivado del sustrato que se ha oxidado anteriormente.

## 1.2. Digestión anaerobia

En la respiración anaerobia se efectúa la degradación de la materia orgánica en ausencia de oxígeno molecular como aceptor de electrones. Tal es el caso, de los procesos de sulfatorreducción, desnitrificación y la digestión anaerobia, empleados frecuentemente en el tratamiento de aguas residuales (Montalvo y Guerrero, 2003). Los procesos de digestión anaerobia ocurren generalmente en la naturaleza, siendo los nichos de estos el fondo de los ríos, los lagos y el mar, las ciénagas y el tracto intestinal de prácticamente todos los animales (Madigan et al., 2003). La aplicación del

proceso de digestión anaerobia es simplemente el desarrollo tecnológico de los procesos que ocurren en la naturaleza.

El metano es uno de los productos finales de la descomposición de la materia orgánica en ambientes anaerobios. La completa eliminación de materia orgánica a metano requiere del metabolismo coordinado y combinado de diferentes grupos de microorganismos. Al menos cuatro grupos tróficos de bacterias han sido aislados de digestores anaerobios en función de los sustratos que utilizan y los productos finales formados. Los grupos de microorganismos son funcionalmente diversos: hidrolíticos, fermentativos, oxidantes de ácidos grasos volátiles (AGV), acetogénicos y metanogénicos (Fig. 1.1).

En la actualidad diferentes autores han considerado que la digestión anaerobia procede de varias etapas sucesivas (Montalvo y Guerrero, 2003; Madigan et al., 2003).

1. Hidrólisis o licuefacción. En esta etapa los compuestos orgánicos son solubilizados por enzimas excretadas por bacterias hidrolíticas que actúan en el exterior celular por lo que se consideran exoenzimas. La hidrólisis es la conversión de los polímeros en sus respectivos monómeros.
2. Acidogénesis. En esta etapa los compuestos orgánicos solubles que comprenden los productos de la hidrólisis son convertidos en ácidos orgánicos tales como acético, propiónico y butírico, fundamentalmente. Las bacterias hidrolíticas-acidogénicas conforman una mezcla muy compleja de muchas especies bacterianas, la mayoría de las cuales son anaerobias obligadas, sin embargo también se presentan anaerobias facultativas. Estas bacterias fermentan una variedad de moléculas orgánicas complejas, convirtiéndolas en una amplia gama de productos finales, tales como ácido acético, mezclas de  $H_2$  y  $CO_2$ , compuestos monocarbonados, ácidos orgánicos de más de dos átomos de carbono y compuestos como propanol, butanol, etcétera.
3. Acetogénesis. Se le conoce también como acidogénesis intermediaria en la cual los productos correspondientes son convertidos en ácido acético, hidrógeno y dióxido de carbono. Las bacterias acetogénicas son las encargadas de la producción de acetato,  $H_2$  y

CO<sub>2</sub> los cuales son los sustratos para las metanogénicas. Estas bacterias son conocidas como sintróficas obligadas y se caracterizan por no poder crecer en cultivos puros. Las bacterias homoacetogénicas producen acetato a partir de sustratos carbonados o partir de la reducción del dióxido de carbono. Estas bacterias son anaerobias estrictas.

4. Metanogénesis. En esta etapa metabólica el metano es producido a partir de ácido acético o de mezclas de hidrógeno y dióxido de carbono, pudiendo formarse también a partir de otros sustratos tales como ácido fórmico y metanol. La última etapa es realizada por un grupo particular de arqueobacterias: las metanogénicas. Son anaerobias estrictas y activas a potenciales de oxido-reducción comprendidos entre -350 y -450 mV. Estas bacterias son capaces de reducir el dióxido de carbono utilizando el hidrógeno producido durante la acetogénesis para producir metano, o bien de metabolizar el acetato, el etanol, y las metilaminas en dióxido de carbono y metano (Atlas y Bartha, 1993). Desde el punto de vista metabólico son los únicos capaces de generar metano y por lo tanto poseen enzimas exclusivas. Las metanogénicas acetoclasticas pueden producir CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> a partir de acetato y las metanogénicas hidrogenotrofas, a partir de H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>, el mayor número de metanógenas pertenece a este grupo.

La digestión anaerobia puede ser utilizada para la eliminación de una gran variedad de compuestos tóxicos (Krumme y Boyd, 1988, Annachhatre y Gheewala, 1996, Mohn y Tiedje, 1992, Ye y Sheng, 2004).

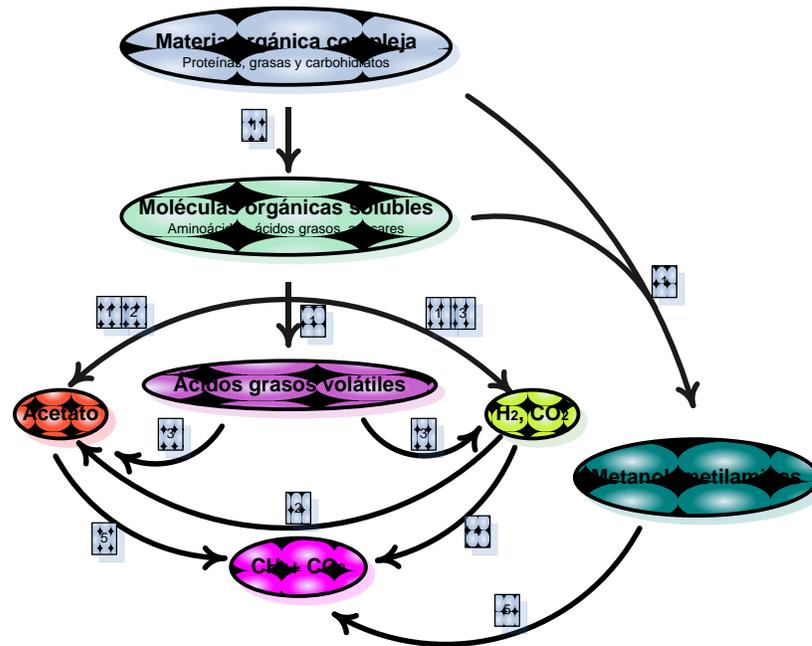


Fig. 1.1 Etapas metabólicas de la digestión anaerobia. Bacterias (1) hidrolíticas-acidogénicas, (2) homoacetogénicas, (3) Acetogénicas, (4) metanogénicas hidrogenófilas, (5) metanogénicas acetoclásticas. Modificado de Montalvo y Guerrero (2003) y Madigan et al., (2003).

### 1.3 Compuestos aromáticos clorados

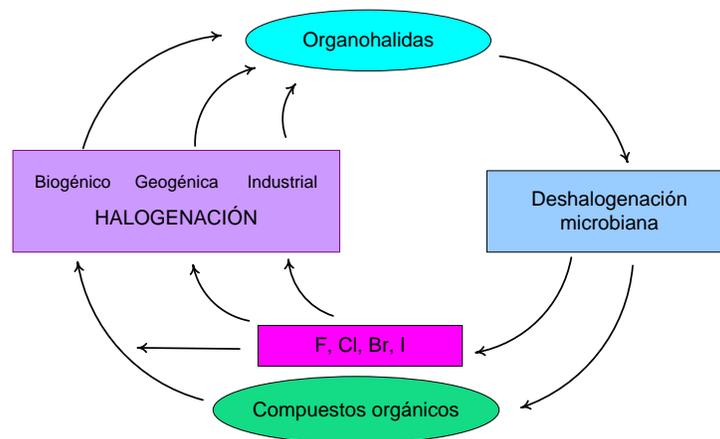
Los compuestos aromáticos halogenados constituyen uno de los mayores grupos de sustancias químicas encontradas en el ambiente. Su uso y abuso en la industria y la agricultura tienen como resultado una gran cantidad de estas sustancias químicas en el ambiente, provocando la contaminación del mismo.

Se ha reportado que un gran número de compuestos halogenados sintéticos derivan de la actividad antropogénica, sin embargo, es importante tener en cuenta que también abundan en la naturaleza y que han estado presentes en la tierra durante millones de años ya que forman parte del ciclo natural del carbono (Gribble, 1994) (Fig. 1.2).

Entre los compuestos halogenados más importantes están los clorofenoles. Algunas actividades antropogénicas como la cloración de agua potable puede conducir a la formación de una gran variedad de subproductos clorados. Estos subproductos pueden formarse como resultado de

reacciones entre fenoles presentes en el agua y el cloro (Stringer y Johnston 2001). También, se ha reportado una gran cantidad de estos compuestos en efluentes de plantas de blanqueo de la pulpa del papel (0.03-600 mg/L), que van desde compuestos alifáticos clorados hasta aromáticos polisustituidos (Kringstad y Lindström 1984; Paasivirta et al., 1985., Suntio et al., 1988; McKague et al., 1989; Jokela y Salkinoja, 1992). Los pesticidas, plaguicidas, herbicidas e insecticidas en su mayoría son compuestos alifáticos o aromáticos clorados, estos compuestos han sido utilizados debido a sus propiedades biocidas. Su efecto puede ser amplio u orientado a una biota específica, por lo que si su liberación no es controlada, se pueden tener graves repercusiones en el ambiente, provocando la contaminación de aguas subterráneas y superficiales.

Se ha reportado que algunos clorofenoles (tetra y pentaclorofenol) se pueden formar durante la combustión de madera (Ahling y Lindskog, 1982) causando su acumulación en sedimentos de lagos (Salkinoja et al., 1984).



**Fig. 1.2** Ciclo de los halógenos. Los microorganismos son responsables de gran manera del rompimiento de los compuestos que han sido introducidos al ambiente a partir de fuentes biogénica, geogénica o antropogénica (Hägglom y Bossert, 2003).

La presencia de los clorofenoles en el ambiente es un serio problema ecológico debido a su alta toxicidad, recalcitrancia y bioacumulación, además, se ha sugerido que pueden ser carcinógenos y mutagénicos (Armenante et al., 1999; Quan et al., 2003). Se ha propuesto que la recalcitrancia de los clorofenoles es el resultado de la estabilidad de su estructura aromática y de su enlace carbono-halógeno, el cual se rompe con gran dificultad, resultando en su acumulación en el ambiente (Farell

and Quilty, 2002). Debido a esto, varios clorofenoles incluyendo el 2-clorofenol (2CP), están incluidos dentro de la lista de contaminantes prioritarios (Keith and Telliard, 1979).

### **1.3.1 2-Clorofenol (2CP)**

El 2-Clorofenol es una sustancia química producida sintéticamente, utilizada como intermediario en la generación de otros productos químicos. Es la materia prima química para la fabricación de fungicidas, bactericidas, antisépticos, desinfectantes y conservadores de madera. Además, el 2CP se utiliza para la formación de intermediarios en la producción de resinas fenólicas y para la extracción de compuestos de azufre y nitrógeno a partir de carbón. El 2-clorofenol también puede presentarse en el ambiente como resultado de la biodegradación de compuestos policlorados a monoclorados (Annachatre y Gheewala, 1996).

#### **1.3.1.1 Propiedades del 2CP**

El 2-clorofenol ( $C_6H_5OCl$ ), es un líquido desde incoloro a ámbar con un olor desagradable (tabla 1.1). El 2CP es altamente soluble en solución acuosa (28.5 g/L) a  $25^{\circ}C$  y pH neutro. Esta característica implica peligro de movilización en suelos, contaminación de acuíferos y acumulación en ecosistemas acuáticos. De acuerdo al coeficiente de partición octanol-agua ( $Kow$  del 2-CP = 2.16), que es una medida de cómo una sustancia química puede distribuirse fácilmente en dos solventes inmiscibles, agua (solvente polar) y octanol (solvente relativamente no polar, que representa a las grasas), el 2CP puede fijarse con firmeza a materia orgánica, sedimentos y microorganismos (partes lipofílicas como membranas celulares). Debido a esto y considerando que la vía de exposición al 2CP puede ser a través de la cadena alimenticia, este compuesto tiende a bioacumularse en la grasa corporal de los animales (Loehr y col., 1988).

**Tabla 1.1 Propiedades fisicoquímicas del 2-CP.**

Punto de fusión	9.3°C
Punto de ebullición	175°C
Densidad relativa a 25°C	1.26
Coefficiente de partición (Kow)	2.16
Constante de Henry @20°C	1.31 x 10 <sup>-2</sup> atm L /mol,
pKa a 25°C	8.48
Solubilidad en agua	28.5 g/L
Peso molecular	128.56
Presión de vapor @20°C	2.9 x 10 <sup>-3</sup> atm

Fuente. Handbook of Environmental Data on Organic Chemicals  
Index Merk (1996).

### 1.3.1.2 Efectos nocivos del 2-Clorofenol (2CP)

Se sabe que el 2CP desencadena una variedad de mecanismos a nivel celular como daño a la membrana (Bradberry y col., 2004), desacoplamiento de la fosforilación oxidativa (Narasimhen y col., 1992) y disrupción del metabolismo de la Acetil CoA (Czaplicka, 2004). En microorganismos y organismos inferiores también se han observado efectos biocidas (Davoren y Fogarty, 2005). Además, el 2CP es muy tóxico para la vida acuática a concentraciones de 2-7 mg/L (Annachhatre y col., 1996). El 2CP ha sido designado como uno de los contaminantes de alta prioridad por la EPA ya que es tóxico, persistente y cancerígeno (ATSDR, 2003).

### 1.3.2 Eliminación biológica de clorofenoles

Se ha reportado que los clorofenoles pueden ser eliminados mediante procesos fisicoquímicos y biológicos (Czaplicka, 2004). Algunos procesos fisicoquímicos que se han utilizado para su degradación son mediante reacciones fotoquímicas o de adsorción, frecuentemente acompañadas con reacciones de oxidación e hidrólisis. Sin embargo este tipo de procesos implica altos costos de operación, incompleta mineralización y posibilidades de causar una contaminación secundaria. Por esta razón los tratamientos biológicos son una alternativa más recomendable.

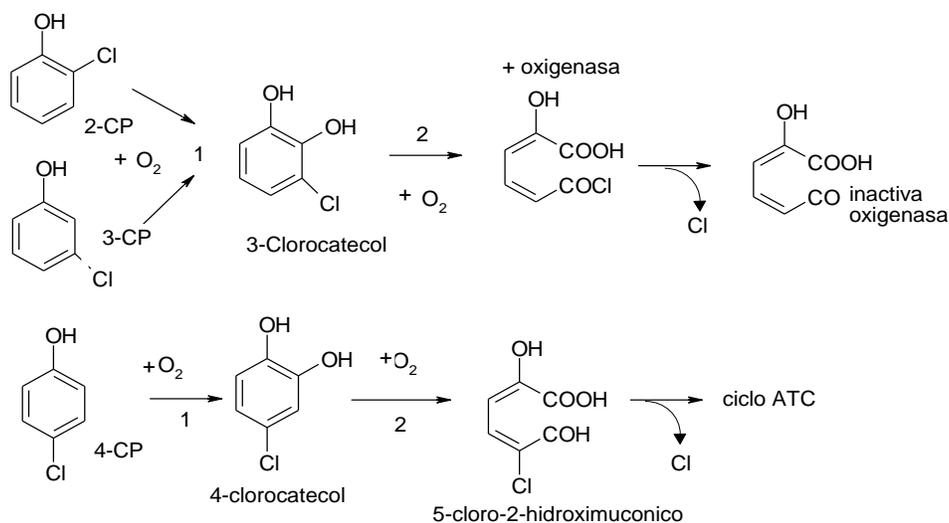
Se ha reportado que la eliminación biológica de los clorofenoles depende del tipo de proceso respiratorio, así como de la posición de sustituyentes en el anillo aromático (Hägglom y Bossert, 2003). Por ejemplo, Farrell y Quilty (1999), reportaron el 3-clorocatecol como principal de la ruta

metabólica del 2CP en condiciones aerobias. Becker et al. (1999) reportaron la producción de biogás como producto principal de la degradación del 2CP en condiciones anaerobias.

Un paso crítico en la eliminación de clorofenoles es el rompimiento del enlace entre el halógeno-carbono, por lo tanto su degradación microbiológica requiere la presencia de enzimas que rompan el enlace bajo condiciones fisiológicas específicas, ya sea en condiciones aerobias o anaerobias.

### 1.3.2.1 Eliminación biológica de clorofenoles en condiciones aerobias

Durante la degradación microbiológica aerobia de clorofenoles, el oxígeno sirve como aceptor de electrones. El paso inicial de la degradación aerobia de los monoclorofenoles es su transformación a clorocatecoles. El 2CP y 3-clorofenol (3CP), producen el 3-clorocatecol, mientras que el 4-clorofenol (4CP) se transforma a 4-clorocatecol (Fig. 1.3). Los clorocatecoles son los metabolitos centrales de la degradación aerobia de la mayoría de los clorofenoles. La ruptura del anillo aromático se puede producir mediante la vía *orto* o *meta*. La mayoría de la ruptura de los clorocatecoles se realiza por vía *meta*.



**Fig 1. 3 Ruta de degradación aerobia. (1) Fenol hidroxilasa, (2) Catecol 2,3-dioxigenasa**  
**Fuente. Farrell y Quilty, (1999).**

Generalmente el rompimiento *meta* del 2CP y 3CP provoca la producción de acilhalidas y acumulación de intermediarios (Klecka and Gibson, 1981; Schmidt et al., 1987) conocidos como “metabolitos suicidas” como el ácido 5-cloroformil-2-hidroxi-penta-2,4-dienoico, debido a que

afectan irreversiblemente a la enzima catecol-2,3-dioxigenasa la cual es la encargada del rompimiento *meta* (Bartels et al., 1984). La degradación del 3-clorocatecol utilizando el rompimiento vía *meta* se ha demostrado (Mars et al., 1997) pero es extremadamente raro. Por su parte, el 4-CP genera al 4-clorocatecol. El rompimiento *meta* del 4-clorocatecol resulta en la producción del 5-cloro-2-hidroximucónico semialdehído (Fig. 1.3) (Wieser et al., 1994), lográndose una completa eliminación del compuesto (Bae et al., 1996; Hollender et al., 1997). Debido a esto, los sistemas aerobios han sido mayormente utilizados para la eliminación del 4CP, ya que no se presenta inhibición de su ruta metabólica.

En la tabla 1.2 se muestran ejemplos de sistemas aerobios que se han reportado para el tratamiento de monoclorofenoles.

Tabla 1.2. Ejemplos de sistemas aerobios para el tratamiento de monoclorofenoles.

Sistema	Inóculo	Condiciones de operación	Compuesto	Resultados	Referencia
Cultivo en lote	<i>Pseudomonas putida</i> CP1	200 mg/L de 2CP y 3CP	2CP, 3CP	E <sub>2CP</sub> 68.4% E <sub>3CP</sub> 99% Acumulación de intermediarios (rompimiento <i>meta</i> )	Farrel y Quilty (1999)
Reactor de lote secuenciado (SBR)	Lodo activado	Carga 0.0075 a 1.2 g 4CP/L·d. Fase llenado, reacción, sedimentación, drenado de 10:370:90:10 min.	4CP	Eliminación 99% Sin acumulación de intermediarios. Rompimiento vía <i>meta</i>	Movahedian et al. (2008)
Reactor de contacto rotatorio (RBC)	Lodo activado	Concentraciones de 2.3 g 4-CP/L y 1.2 g 2,4-DCP/L TRH=0.7 d	2,4 DCP, 4CP	E <sub>4CP</sub> 97% E <sub>2,4 DCP</sub> 95% Sin acumulación de intermediarios. (rompimiento <i>meta</i> )	Sahinkaya y Dilek (2006)
Reactor de lote secuenciado (SBR)	Lodo activado	[FENOL] = 525 mg/L [4CP] = 105-2100 mg/L Fase llenado, reacción, sedimentación, drenado de 1:9.5:1:0.5 h TRH=10.5 d TRS= 30 d	Fenol, 4CP	q <sub>S</sub> = 78 mg C-Fenol/ g SSV·d q <sub>S</sub> = 7.68 mg C-4CP/ g SSV·d Sin acumulación de intermediarios. (rompimiento <i>meta</i> ) E <sub>4CP</sub> 94% E <sub>Fenol</sub> 99%	Monsalvo et al. (2009)

Con base en lo anterior se puede decir que la utilización de un tratamiento aerobio para la mineralización del 2CP no siempre es una buena opción, ya que solo podría ser transformado a un intermediario que se acumula.

### 1.3.2.2 Eliminación biológica de clorofenoles en condiciones anaerobias

Se ha reportado que la mayoría de los clorofenoles pueden ser deshalogenados bajo condiciones anaerobias (Becker et al. 1999; Bhatt et al. 2007; Beristain et al. 2010). Aunque no siempre, el tipo de reacción que generalmente interviene es la hidrogenólisis. La deshalogenación via hidrogenólisis es un proceso reductivo, el cual requiere de equivalentes reducidos para llevar a cabo la reacción, la cual se denomina “deshalogenación reductiva”. El término “deshalorespiración” ha sido vinculado a bacterias anaerobias que acoplan la deshalogenación reductiva de compuestos alifáticos o aromáticos clorados a la síntesis de ATP vía cadena de transporte de electrones (Fig 1.4). La deshalogenación reductiva no puede ser posible en presencia de  $O_2$  ya que el valor energético de los equivalentes reducidos es muy bajo en condiciones aerobias (+900 mV).

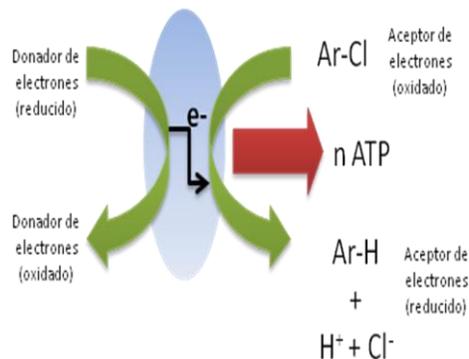


Fig 1.4. Esquema de la Deshalorespiración (Häggbloom y Bossert, 2003).

Ide et al. (1972), fueron los primeros en sugerir el proceso de deshalogenación reductiva, al realizar estudios sobre la degradación anaerobia del pentaclorofenol en suelos de cultivos de arroz.

#### 1.3.2.2.1 Deshalogenación reductiva

Los valores de  $\Delta G^\circ$  de la deshalogenación reductiva de compuestos halogenados se encuentran en un intervalo de -130 a 180 KJ/mol de halógeno removido, que corresponden a un potencial redox de  $E^\circ$  de +260 a 480 mV (Holmes et al., 1996; Dolfing J. y Harrison B., 1992). Con estas características los clorofenoles son excelentes aceptores de electrones ya que tienen potenciales

redox comparables con  $\text{NO}_3^- / \text{NO}_2^-$  ( $E'_{\circ} = +433 \text{ mV}$ ). Estos son valores más grandes que los valores para  $\text{SO}_4^- / \text{SH}^-$  ( $E'_{\circ} = -150 \text{ mV}$ ) y  $\text{HCO}_3^- / \text{CH}_4$  ( $E'_{\circ} = -250 \text{ mV}$ ), lo que sugiere que los microorganismos deshalogenantes pueden competir por los equivalentes reducidos con los sulfatorreductores y metanógenos cuando estos están limitados (Häggblom y Bossert, 2003).

La deshalogenación reductiva se puede llevar a cabo en condiciones desnitrificantes (Bae et al., 2002), sulfatorreductoras (Häggblom y Young, 1993) y metanogénicas, sin embargo, la reacción de deshalogenación es termodinámicamente favorecida en la metanogénesis debido a que es el ambiente más reducido ( $\text{potencial redox, } \text{O}_2 > \text{NO}_3^- > \text{SO}_4^- > \text{HCO}_3^-$ ).

Las reacciones de deshalogenación son llevadas a cabo por microorganismos aerobios, facultativos y anaerobios, correspondientes a los tres reinos filogenéticos (Bacteria, Archaea y Eukarya), y son una parte integral de los procesos metabólicos (El Fantroussi et al., 1998; Fetzner, 1998; Reineke, 2001).

*Desulfomonile tiedjei* fue el primer organismo aislado de un cultivo puro capaz de obtener energía para su crecimiento de la deshalogenación reductiva del 3-clorobenzoato a benzoato (Fig. 1.5) (Suflita et al., 1982).

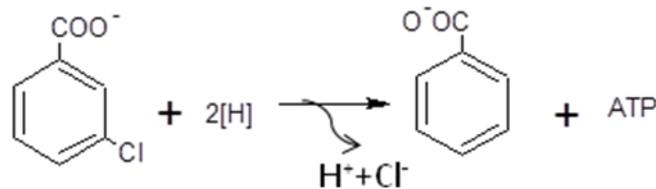


Fig. 1.5 Utilización del 3-Clorobenzoato como aceptor de electrones.

Debido a que los miembros de *Desulfitobacteria* son nutricionalmente versátiles, con estos microorganismos se ha observado la deshalogenación de clorofenoles con posiciones orto-, meta- y para-. La tabla 1.3, muestra algunas especies de *Desulfitobacteria* que han sido aisladas de cultivos en presencia de diferentes clorofenoles, los cuales son capaces de llevar a cabo la deshalogenación reductiva.

**Tabla 1.3. Microorganismos aislados de diferentes fuentes en presencia de compuestos clorados.**

Microorganismo	Fuente	Compuesto	Referencia
<i>D. dehalogenans</i>	Sedimentos de agua dulce	3-cloro-4-hidroxifenilacetato	Utkin I. et al., 1994
<i>D. hafniense</i>	Lodos de aguas municipales	2,4,6-triclorofenol	Christiansen N. y Ahring B., 1996
<i>D. chlororespirans</i>	Suelo de composta	2,3- diclorofenol	Sanford R. et al., 1996
<i>D. frappieri</i>	Lodo anaerobio	Pentaclorofenol	Bouchard B. et al., 1996
<i>D. frappieri</i>	Sedimentos del Rio Saale	2,4,6-triclorofenol	Breitenstein A., 2001
Strain sp.	Lodo anaerobio	2CP	Cole J. et al., 1994

Las reacciones de deshalogenación pueden ser llevadas a cabo por anaerobios estrictos y anaerobios facultativos (Gibson y Harwood, 2002). Otras bacterias del género *Pseudomonas*, *Anaeromyxobacter*, *Desulfitobacterium*, *Sulfurospirillum*, *Desulfomonile*, *Desulfuromonas*, *Desulfovibrio*, *Trichlorobacter*, *Cloroflexi* también han sido asociadas con la deshalogenación reductiva y en la mayoría de los casos utilizan H<sub>2</sub> como donador de electrones (Smidt y Vos, 2004).

#### 1.3.2.2.2 Ruta metabólica de la digestión anaerobia del 2CP

Algunos autores han reportado la ruta metabólica de mineralización de los clorofenoles por digestión anaerobia, en el caso particular del 2CP se ha sugerido la presencia de fenol como el primer intermediario producto de la deshalogenación reductiva (Becker et al. 1999, Bhatt et al. 2007, Beristain et al. 2010). Como segundo intermediario de esta vía, mencionan al benzoato y proponen que probablemente surge vía carboxilación o deshidroxilación del fenol (Becker et al. 1999). Se sugiere también, una ruta alterna que sucede al adicionar fenol y peptona de proteasa al 2CP, en este caso se produce 3-Clorobenzoato (3-CB) que es un compuesto recalcitrante y que probablemente es consecuencia de la deshidroxilación del 2CP (Becker et al. 1999). Posteriormente ocurre la fisión del anillo aromático y la acetogénesis, en donde se genera el acetato el cual es utilizado para llevar a cabo la metanogénesis (Bhatt et al. 2007, Beristain et al. 2010) (Fig. 1.6).

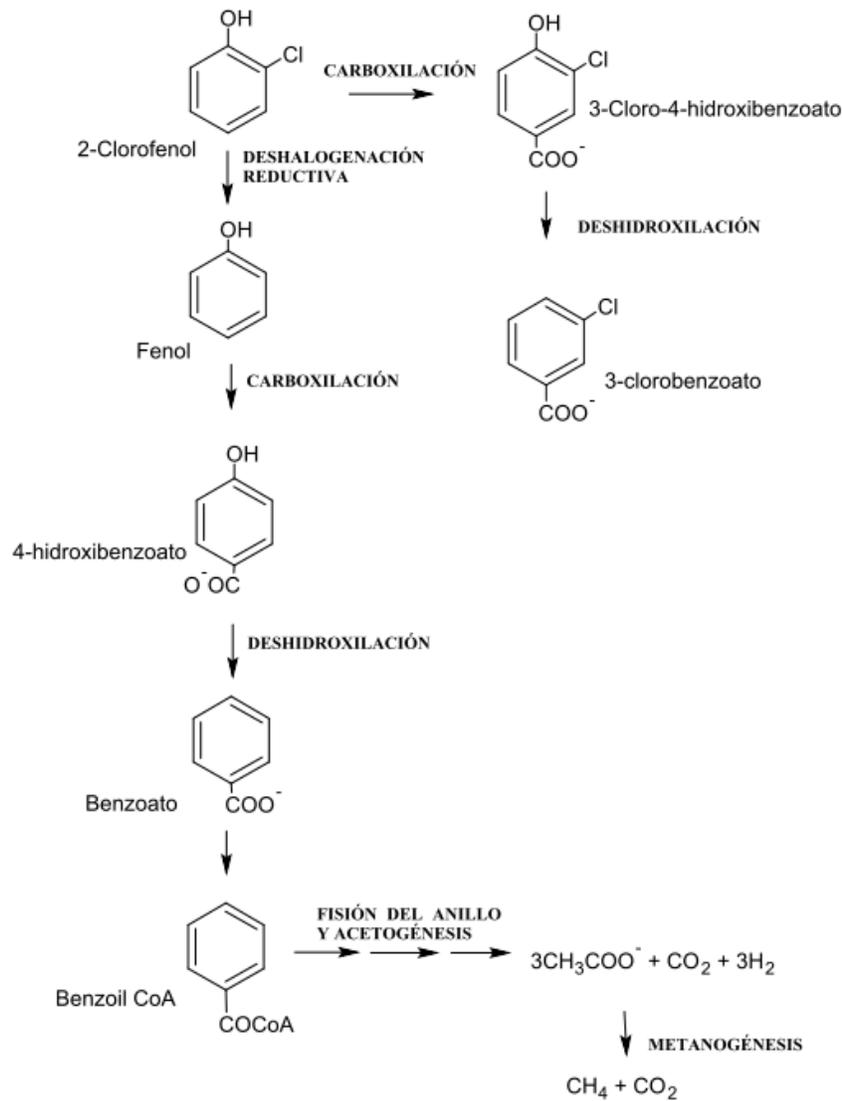


Fig. 1.6 Ruta metabólica de la digestión anaerobia del 2CP.

### 1.3.2.2.3 Sistemas de tratamiento anaerobios metanogénicos

La velocidad de consumo de los monoclorofenoles es usualmente más lenta en comparación con los fenoles policlorados, resultando en la acumulación de monoclorofenoles en los sistemas (Kohring et al., 1989; Zhang and Wiegel, 1990), por esta razón el estudio de la completa mineralización de monoclorofenoles es importante. Se han sugerido dos factores que pueden favorecer el consumo de los clorofenoles: la adición de un donador de electrones y la aclimatación.

Al respecto, Reardon et al. (2002), mencionó que la adición de compuestos orgánicos como donadores de electrones puede ayudar a reducir la toxicidad inhibiendo el efecto de los clorofenoles en las células o activando las enzimas degradativas incrementando la transformación de los mismos. Los donadores de electrones utilizados más comunes durante la degradación de clorofenoles son: azúcares (Basu and Oleszkiewicz, 1995; Wang and Loh, 1999; Tarighian et al., 2003), peptona (Sahinkaya and Dilek, 2006) y extracto de levadura (Madsen y Aamand, 1992). Se ha sugerido que tener un periodo de aclimatación puede favorecer la capacidad del cultivo debido principalmente a la selección de microorganismos especializados en el consumo del compuesto (Rittman y McCarty, 2001; Wang et al., 2003; Buitrón y Moreno 2004) o a la inducción de sistemas enzimáticos asociados con el consumo de compuestos recalcitrantes (Ellis et al., 1996; Tomei et al. 2003).

Algunos autores han utilizado uno o ambos factores para la eliminación del 2CP. En cultivos en lote, Basu y col. (1996), evaluaron extracto de levadura y acetato como donadores de electrones. Ellos utilizaron un lodo aclimatado por exposición de un 1 año al 2CP. Después del periodo de aclimatación evaluaron la degradación de 28.5 mg C-2CP/L. Ellos observaron que el 2CP se consume sin la presencia de una fase de adaptación obteniendo velocidades específicas de consumo ( $q_s$ ) de 0.002 mg C-2CP/g SSV·d con extracto de levadura y 0.0014 mg C-2CP/g SSV·d con acetato. Los autores evidenciaron que utilizar 0.1% de extracto de levadura como donador de electrones favorece la deshalogenación reductiva y por lo tanto la  $q_s$ . En esta investigación enfocaron sus estudios a la evaluación de donadores de electrones para mejorar el consumo de 2CP, sin embargo, no cuantificaron la producción de fenol como producto de la deshalogenación o biogás como indicadores de la mineralización del 2CP.

Ye y Sheng (2004), utilizaron 1g sacarosa/L como donador de electrones, la aclimatación se obtuvo exponiendo el lodo a 17 mg C-2CP/L por 65 y 100 días. Después de estos tiempos se obtuvieron  $q_s$  de 0.14 mg C-2CP/g SSV·d y 0.21 mg C-2CP/g SSV·d. En esta investigación se da evidencia de que la aclimatación y la presencia de un donador de electrones pueden reducir la fase de adaptación además de incrementar la  $q_s$ . Es importante mencionar que los autores sólo cuantificaron la desaparición del compuesto y no la producción de intermediarios como fenol o biogás.

En estos dos trabajos se da evidencia de que tanto el donador como el tiempo de aclimatación influyen en la  $q_s$ , sin embargo en ambas investigaciones falta la realización del balance de materiales.

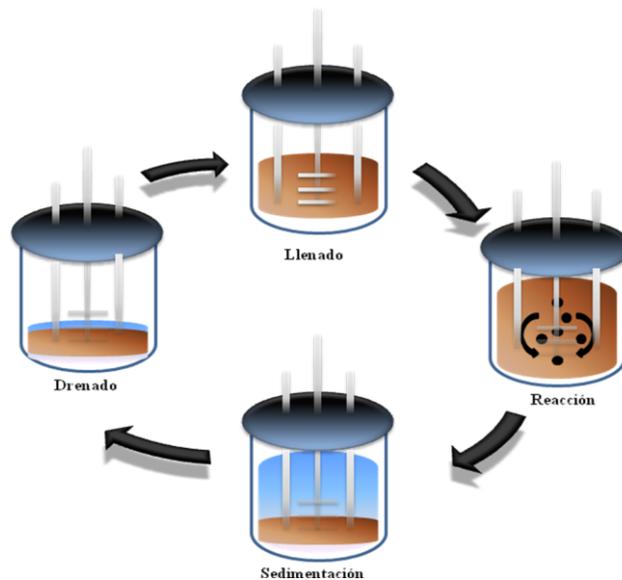
En sistemas en continuo también se tienen algunos trabajos relacionados al tratamiento del 2CP, por ejemplo Chang et al. (2003), utilizando un SMBR (Silicone membrane Biorreactor) trataron 14 mg C-2CP/L utilizando  $H_2$  como donador de electrones. La aclimatación se realizó incrementando la concentración hasta 14 mg C-2CP/L por 110 días. Después de este periodo se obtuvo una  $E \geq 92.8\%$  y una tasa de remoción de 20 mg C-2CP/L·d. En esta investigación sólo se enfocan en la necesidad de tener un donador de electrones ( $H_2$ ) en su sistema para llevar a cabo la deshalogenación, tomando en cuenta únicamente la desaparición del 2CP y la presencia de fenol como un resultado satisfactorio. Dietrich y Winter (1990), trabajaron con un AFBR (Anaerobic fixed batch reactor) con extracto de levadura y peptona como donadores de electrones con un periodo de aclimatación del lodo de 4 semanas a 70 mg C-2CP/L. Después de este periodo alcanzaron para el tratamiento de 1.1 g C-2CP/L una tasa de remoción de 0.1 g C-2CP/L·d, sin embargo debido a la alta concentración experimental observaron la acumulación de fenol.

Como se ha evidenciado, la mayoría de los reportes encontrados utilizan como donador de electrones una fuente de carbono fácilmente degradable. Sin embargo, en escasas ocasiones se ha sugerido el fenol como donador de electrones aún cuando además de donar electrones puede favorecer su consumo debido a la similitud con la estructura de los clorofenoles (Bhatt et al., 2007). Como se ha mencionado, los sistemas requieren un inóculo con un periodo largo de aclimatación (31-365 días) previo a su utilización, además se ha sugerido que son importantes las condiciones en las cuales se lleva a cabo la aclimatación (Moreno y Buitrón, 2004). Por ejemplo, Watson (1993) sugirió dos procedimientos de aclimatación para la biodegradación de seis compuestos químicos tóxicos, y llegó a la conclusión de que la aclimatación en un solo frasco fue más eficaz en comparación con la aclimatación por enriquecimientos o múltiples procedimientos de transferencia.

Varios estudios han mostrado que la utilización de reactores de lote secuenciado (SBR) favorece la aclimatación durante sus ciclos de operación logrando algunas ventajas para el tratamiento de compuestos tóxicos como los clorofenoles, tal es el caso de la eliminación de una larga etapa previa de aclimatación (Irvine y Ketchum, 1989). También, se ha sugerido su utilización como una opción

viable para el tratamiento de aguas residuales debido a que soportan fluctuaciones en los flujos de aguas residuales (Irvine et al, 1997). Además, tienen una alta flexibilidad operativa (Tomei et al., 2003) lo cual los hace capaces de imitar sistemas de flujo continuo obteniendo rendimientos similares o superiores (Grady et al., 1999).

La operación de estos reactores consiste en la repetición de los ciclos, cada ciclo consiste en cuatro pasos: llenado, reacción, sedimentación y drenado (Fig. 1.7).



**Fig. 1.7 Ciclos de operación de un reactor de lote secuenciado (SBR)**

En la mayoría de las ocasiones se utilizan tanques agitados con lodos activados como inóculo. Se han encontrado estudios en donde los reactores SBR han sido frecuentemente utilizados como sistemas de degradación de clorofenoles en condiciones aerobias (Quan et al. 2003; Buitrón y Moreno 2004; Sahinkaya y Dilek, 2006; Nalbur y Alkan, 2007; Movahedyan et al. 2008; Monsalvo et al. 2009). Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, la eliminación de algunos clorofenoles, incluyendo el 2CP en condiciones aerobias presenta el inconveniente de la acumulación de intermediarios, lo cual provoca la incompleta mineralización del compuesto.

Los reactores anaerobios de lote secuenciado (ASBR) utilizan la misma forma de operación y presentan las mismas ventajas que los reactores SBR además de la producción de biogás (Arnaldo et al., 2007; Li et al., 2003), con la diferencia de que el proceso del ASBR se lleva a cabo sin aireación y preferentemente bajo condiciones reducidas (Arnaldo et al, 2007.; Sirianuntapiboona y

Hongsrisuwan 2007), por esta razón son una alternativa factible para el tratamiento de clorofenoles que requieren condiciones anaerobias para su eliminación.

La utilización de reactores anaerobios de lote secuenciado es una tecnología reciente la cual se atribuye a una revalorización creciente de las ventajas de los procesos anaerobios así como el estudio de la bioquímica y microbiología anaerobia. Los reactores ASBR, se utilizan actualmente para el tratamiento de residuos sólidos urbanos (Kennedy and Lentz, 2000; Bodík et al., 2002), lixiviados (Dugba and Zhang, 1999) y productos lácteos (Arnaldo et al., 2007).

Hasta el momento solo ha sido reportada por Gupta y Mali (2008) la deshalogenación reductiva del 1,2-dicloroetano (1,2-DCA) con un ASBR utilizando acetato y dextrosa como donadores de electrones. Ellos obtuvieron una  $q_s$  0.0362-0.181 g DQO/ g VSS·d. Durante un tiempo de operación de 266 días, el cultivo consumió concentraciones por arriba de 50 mg DCA/L con un tiempo de retención de 48 h. Ellos encontraron etano como producto de la deshalogenación del eteno. Es importante mencionar que en esta investigación recomiendan el uso de los ASBR como una tecnología práctica para la descontaminación de agua residual que contiene compuestos organoclorados.

Hasta el momento no se han encontrado estudios relacionados con la mineralización del 2CP en reactores anaerobios de lote secuenciado, por lo que es necesario realizar investigaciones para poder aportar información novedosa al respecto.

### **1.3.2.3 Eliminación de clorofenoles en sistemas aerobios-anaerobios**

La velocidad de consumo de los monoclorofenoles son usualmente lentas, se ha propuesto que se puede llegar a mejorar el consumo de éstos mediante la utilización de reactores aerobios-anaerobios serie (Majumber and Gupta, 2007), el uso de condiciones microaerofilicas o condiciones parcialmente aireadas (Garibay et al., 2005).

Por ejemplo, Majumder y Gupta (2007), utilizaron un reactor UASB (Upflow anaerobic sludge blanked) y RBC (Rotating Biological Contactors) en serie (anaerobio/aerobio) para la eliminación de 18.6 mg C-2CP/L con 3 g acetato de sodio/L como donador de electrones. La estrategia de

aclimatación fue el incremento de carga de 1 a 18.5 mg C-2CP/L por 25 días y un mantenimiento por 190 días con 18.6 mg C-2CP/L. Después de este periodo obtuvieron eficiencias de consumo  $E \geq 90\%$  y  $q_s$  de 5.5 mg C-2CP/g SSV·d. En esta investigación se evidenció la mineralización del compuesto únicamente con la presencia de dióxido de carbono, sin embargo, no se realizó un balance de materiales. En esta investigación se evidenció la viabilidad de utilizar un sistema anaerobio-aerobio para mineralizar el 2CP.

Garibay et al. (2005) utilizaron un reactor de lecho fluidizado parcialmente aireado para la eliminación de 2,4,6 triclorofenol (TCP). Fueron evaluadas cargas de aire de 0.001 vvm, 0.01 vvm y un control metanogénico para la remoción de una mezcla de 29 mg C-TCP/L·d y 15 mg C-fenol/L·d. Ellos utilizaron sacarosa como donador de electrones con una carga de 1 g DQO-sacarosa/L·d. Observaron que la eficiencia de remoción del TCP y fenol para los tres casos fue del 100%. La producción de metano fue afectada negativamente ya que en el reactor control obtuvieron  $0.29 \pm 0.10$  L/LFB·d y con las cargas de 0.001 y 0.01 vvm alcanzaron  $0.04 \pm 0.02$  y  $0.02 \pm 0.01$  L/LFB·d respectivamente. Con estos resultados se puede inferir la actividad metanogénica puede ocurrir en condiciones parcialmente aireadas aunque con una menor actividad. De esta manera se estaría produciendo menos metano y más dióxido de carbono que en términos de contaminación es más recomendable. Sin embargo, en este estudio no dan una explicación del papel que juega el oxígeno en la eliminación del TCP.

#### **1.4 Dinámica de poblaciones**

Se han utilizado técnicas microbiológicas convencionales basadas en el aislamiento de cultivos puros y análisis morfológicos, metabólicos, bioquímicos y genéticos, los cuales han proporcionado información sobre la biodiversidad de las comunidades microbianas en sistemas naturales e ingenieriles. Sin embargo, estas técnicas presentan algunos inconvenientes tales como un conocimiento incompleto sobre sus necesidades fisiológicas (nutricionales y fisicoquímicas) y sus relaciones simbióticas.

La posibilidad de identificar poblaciones específicas de microorganismos en su hábitat natural sin la necesidad de aislarlos está revolucionando la ecología microbiana y ha dado lugar a nuevas aplicaciones en numerosos campos de investigación. El uso de herramientas

moleculares para el estudio de la dinámica poblacional de cultivos tiene la finalidad de identificar los cambios poblacionales y entender el papel de los microorganismos en los diversos sistemas con ayuda de estudios fisiológicos (Godon et al., 1997; Sekiguchi et al., 1998). Sin embargo, es necesario seleccionar un método molecular apropiado para el estudio de las comunidades en consorcios microbianos. Algunos de los métodos más utilizados son la electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE), hibridación in situ por fluorescencia (FISH), reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR), etc.

Se ha encontrado una creciente popularidad en la utilización de la técnica de electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE), reflejada en el número cada vez mayor de las investigaciones que utilizan esta técnica. La DGGE es una técnica de rastreo molecular, debido a que permite discernir diferencias o composiciones discretas entre moléculas de DNA de complejidad variable; por ejemplo, en fragmentos de DNA del mismo tamaño es posible discernir entre pequeñas variaciones en el contenido de GC de diferentes secuencias. La DGGE se basa en la diferente movilidad de los fragmentos de ADN del mismo tamaño pero con diferentes secuencias de ácidos nucleicos en el gel de desnaturización, generando así bandas patrones. Idealmente, el perfil electroforético (definido por el número de bandas) reflejará la abundancia relativa de miembros diferentes de una comunidad microbiana (Muyzer y col., 1993), por lo que es altamente recomendada para determinar la filogenia de los miembros de las comunidades (Ferris y col., 1996; Watanabe y col., 2000). Junto con la secuenciación y el análisis filogenético de las bandas, este método puede dar una buena visión general de la composición de una comunidad microbiana. La DGGE ha sido empleada en la caracterización de una amplia gama de hábitats, tales como el suelo, bacterioplancton, aguas termales, aguas continentales, etc. Aunque esta técnica ha sido poco aplicada en el tratamiento anaerobio de aguas residuales, en los últimos años parece ser cada vez más popular. Por ejemplo, se ha utilizado para la evaluación de la diversidad microbiana de los lodos granulares de reactores UASB de la industria cervecera (Chan et al., 2001), destilerías de alcohol (Akarsubasi et al., 2006) e industria papelera (Buzzini et al., 2006).

La dinámica de las poblaciones nos permite relacionar la estabilidad fisiológica con la composición microbiana, es decir, si un ecosistema funcionalmente estable implica

necesariamente una comunidad constante o si una comunidad variable implica variaciones en el patrón respiratorio.

#### 1.4.1 Estudio de comunidades microbianas en reactores anaerobios

Se ha reportado que las asociaciones sintróficas de los consorcios microbianos son necesarias para la mineralización de compuestos orgánicos complejos, como los clorofenoles. Algunos autores han realizado estudios para conocer la dinámica poblacional durante la degradación de clorofenoles por medio de la DGGE.

Por ejemplo, Tartakovsky et al., (2001), investigaron la dinámica poblacional de un reactor UASB capaz de degradar pentaclorofenol (PCP). El inóculo fue adaptado por 60 días con 2 mg PCP/L<sub>R</sub>·d, posteriormente la estrategia de operación del sistema fue aumentar la carga volumétrica de 2 a 65 mg PCP/L<sub>R</sub>·d. Ellos observaron la aparición de 3,4,5-clorofenol, 3,5-clorofenol y 3-clorofenol como intermediarios en el efluente. Además, reportaron la disminución en la producción de metano y acumulación de AGV al incrementar las cargas. Sugieren que aunque los metanógenos no están implicados en la dechlorinación éstos son muy sensibles a la presencia de clorofenoles. Los perfiles electroforéticos de la DGGE para el dominio Bacteria revelaron una correlación entre la aparición de intermediarios de la deshalogenación y la aparición de bandas. En contraste, ellos no realizaron DGGE para el dominio Archaea. La secuenciación de los fragmentos del 16S-ADNr, sugirieron la proliferación de *Clostridium* y *Syntrophobacter/Syntrophomonas sp.*, en el reactor durante la degradación del PCP. Lanthier et al., 2005, reportaron la degradación del pentaclorofenol (PCP), en un biorreactor de película fija (FF). El inóculo utilizado fue un lodo granular desintegrado proveniente de un reactor UASB. El consorcio metanogénico fue aclimatado incrementando las concentraciones de PCP. Después de 225 días de aclimatación, el reactor logró un tasa de remoción de 1.2 µM/d y una eficiencia de remoción del 99%. Ellos encontraron como principal intermediario residual al 3CP. El análisis de PCR/DGGE, mostró la estabilización del biofilm después de 56 días de operación. Encontraron modificaciones importantes en los perfiles del género Bacteria entre el lodo original y el del reactor, permaneciendo solo el 33% de las bandas durante la operación del reactor. Ellos reportaron la presencia de una bacteria halorespiradora en el biofilm, *Desulfitobacterium hafniense*, la cual fue detectada desde el inicio del periodo de aclimatación. *D.*

*hafniense* representó el 19% de las comunidades presentes en el biofilm. Ellos sugieren que la presencia de *D. hafniense* es crucial para el funcionamiento del reactor.

## 1.5 Referencias

1. Ahling B., Lindskog A. (1982). Emission of chlorinated organic substances from combustion. In: Hutzinger O., Frei R.W., Merian E., Pocchiari F. (Eds) Chlorinated Dioxins and Related Compounds Pergamon Press, Oxford. 215-225.
2. Akarsubasi A., Ince O., Oz N., Kirdar B., Ince B. (2006). Evaluation of performance, acetoclastic methanogenic activity and archaeal composition of full-scale UASB reactors treating alcohol distillery wastewaters. *Process Biochem.* 41(1):28–35.
3. Annachatre A., Gheewala S. (1996). Biodegradation of chlorinated phenolic compounds. *Biotechnol. Adv.* 14: 35–56.
4. Armenante, P., Kafkewitz D., Lewandowski G., Jou C. (1999). Anaerobic-aerobic treatment of halogenated phenolic compounds. *Water. Res.* 33: 681-692.
5. Arnaldo S., Bruna S., Marcelo Z., Eugenio F. (2007). Anaerobic sequencing batch reactors in pilot-scale for domestic sewage treatment. *Desalination* 216:174–182.
6. ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry (2005). Comprehensive Environmental Response, Compensation, and Liability Act (CERCLA) priority list of hazardous substances. Available from: <http://www.atsdr.cdc.gov/cercla/05list.html>
7. Atlas R., Bartha R. (1993). *Microbial Ecology: Fundamentals and Applications* 3rd edition. Benjamin/Cummings Pub. Co. (Redwood City, California.). 449-450.
8. Bae H., Lee J., Kim Y., Lee S. (1996). Biodegradation of the mixtures of 4-chlorophenol and phenol by *Comamonas testosteroni* CPW301. *Biodegradation* 7: 463-469.
9. Bae H., Yamagishi T., Suwa Y. (2002). Evidence for degradation of 2-chlorophenol by enrichment cultures under denitrifying conditions. *Microbiol.* 148: 221-227.
10. Bartels I., Knackmuss H., Reineke W. (1984). Suicide inactivation of catechol 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas putida* mt-2 by 3-halocatechols. *Applied and Environmental Microbiology* 47: 500-505.
11. Basu S., Oleszkiewicz J., Sparling R. (1996). Dehalogenation of 2-Chlorophenol in anaerobic batch cultures. *Elsevier Science.* 30: 315-322.
12. Becker G., Sthal D., Rittmann B. (1999). Reductive Dehalogenation and conversion of 2-Chlorophenol to 3-Chlorobenzoate in a Methanogenic Sediment Community: Implication

- for Predicting the Environmental fate of Chlorinated Pollutants. *Applied and Environ. Microbiol.* 65:5169-5172.
13. Beristain-Montiel L., Gómez-Hernández J., Monroy-Hermosillo O., Cuervo-López F., Ramírez-Vives F. (2010). Methanization and mineralization of 2-chlorophenol by anaerobic digestion. *Water Sci. Technol.* 62:1791–1798.
  14. Bhatt P., Kumar S., Mudliar S., Chakrabarti T. (2007). Biodegradation of Chlorinated Compounds-A Review. *Critical Rev. Environ. Sci. Technol.* 37:165-198.
  15. Bodík B., Herdová M., Drtil. (2002). The use of upflow anaerobic filter and ASBR for wastewater treatment at ambient temperature. *Water Res.* 36 (4):1084–1088.
  16. Bradberry S. M., Proudfoot A., Vale J. (2004). Poisoning Due to Chlorophenoxy Herbicides. *Toxicological Reviews* 23:65-73.
  17. Breitenstein A., Saano A., Salkinoja-Salonen M., Andreesen J.R., Lechner U. (2001). Analysis of a 2,4,6-trichlorophenol dehalogenating enrichment culture and isolation of the dehalogenating member *Desulfitobacterium frappieri strain* TCP. A. *Arch Microbiol.* 175:133–142.
  18. Bouchard B., Beaudet R., Villemur R., McSween G., LeÂpine F., Bisailon, J.G. (1996). Isolation and characterization of *Desulfitobacterium frappieri* sp. nov., an anaerobic bacterium wich reductively dechlorinates pentachlorophenol to 3-chlorophenol. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46: 1010-1015.
  19. Buitrón G., Moreno J., (2004). Modeling of the acclimation/deacclimation process of a mixed culture degrading 4-chlorophenol. *Water. Sci. Tech.* 49 (1): 79-86.
  20. Buzzini A., Sakamoto I., Varesche M. (2006). Evaluation of the microbial diversity in an UASB reactor treating wastewater from an unbleached pulp plant. *Process Biochem.* 41:168–176.
  21. Chan O., Liu W., Fang H. (2001). Study of microbial community of brewery treating granular sludge by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rRNA gene. *Water science and technology.* 43(1): 77-82.
  22. Chang C., Tseng S., Chang C., Ho C. (2003). Reductive dechlorination of 2-chlorophenol in a hydrogenotrophic gas-permeable, silicone membrane bioreactor. *Bioresour. Technol.* 90:323–328.

23. Christiansen N., Ahring B. (1996). *Desulfitobacterium hafniense* sp. nov., an anaerobic, reductively dechlorinating bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46:442–448.
24. Cole J.R., Cascarelli A.L., Mohn W.W., Tiedje J.M. (1994). Isolation and characterization of a novel bacterium growing via reductive dehalogenation of 2-chlorophenol. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:3536–3542.
25. Comisión Nacional del Agua (2009). Situación del Subsector Agua potable, Alcantarillado y Saneamiento. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Edición 2009. México D.F.
26. Czaplicka M. (2004). Sources and transformation of chlorophenols in the natural environment. *The Science of the Total Environment* 322: 21-39.
27. Davoren, M., Fogarty, A.M. (2005). Ecotoxicological evaluation of the biocidal agents sodium o-phenylphenol, sodium o-benzyl-p-chlorophenol and sodium p-tertiary amylphenol. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 60:203–212.
28. DeWeerd K.A., Mandelco L., Tanner R.S., Woese C.R., Suflita J.M. (1991). *Desulfumonile tiedjei* gen. nov. and sp. nov., a novel anaerobic, dehalogenating, sulfate-reducing bacterium. *Arch. Microbiol.* 154:23-30.
29. Dietrich G., Winter J. (1990). Anaerobic degradation of chlorophenol by an enrichment culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34:253–258.
30. Dolfing J., Harrison B.K. (1992). The Gibbs free energy of formation of halogenated aromatic compounds and their potential role as electron acceptors in anaerobic environments. *Environ. Sci. Technol.* 26:2213-2218.
31. Dugba P.N., Zhang R. (1999). Treatment of dairy wastewater with two stage anaerobic sequencing batch reactor systems: thermophilic versus mesophilic operations. *Bioresour. Technol.* 69:225–233.
32. El Fantroussi S., Naveau H., Agathos S.N. (1998). Anaerobic dechlorinating bacteria. *Biotechnol. Prog.* 14:167-188.
33. Ellis T.G., Smets B.F., Magbanua Jr B.S., Grady Jr. C.P.L. (1996). Changes in measured biodegradation kinetics during the long-term operation of completely mixed activated sludge (CMAS) bioreactors. *Water Sci. Technol.* 34:35–42.

34. Farrel A., Quilty B. (1999). Degradation of mono-chlorophenols by mixed microbial community via a *meta*-cleavage pathway. *Biodegradation* 10:353-362.
35. Ferris M.J., Muyzer G., Ward D.M. (1996). Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community. *Applied and environmental microbiology*. 62: 340-346.
36. Fetzner S. (1998). Bacterial dehalogenation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50:633-657.
37. Garibay-Orijel C., Ríos-Leal E., García-Mena J., Poggi-Varaldo H. (2005). 2,4,6-Trichlorophenol and phenol removal in methanogenic and partially aerated methanogenic conditions in a fluidized bed bioreactor. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 80: 1180-1187.
38. Gibson J., Harwood C. (2002). Metabolic diversity in aromatic compounds utilization by anaerobic microbes. *Ann. Rev. Microbiol.* 56: 345-369.
39. Godon J.J., Zumstein E., Dabert P., Habouzit F., Moletta R. (1997). Microbial 16S rDNA diversity in an anaerobic digester. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2802-2813.
40. Grady Jr. C.P.L., Smets B.F., Barbeau D.S. (1996). Variability in kinetic parameter estimates: a review of possible causes and a proposed terminology. *Water Res.* 30:742-748.
41. Gribble G.W. (1994). The natural production of chlorinated compounds. *Environ. Sci. Technol.* 28:310-319.
42. Gupta S. K., Mali S. C. (2008). Reductive dechlorination of 1, 2-dichloroethane using anaerobic sequencing batch reactor (ASBR). *Water Science and Technology.* 57(2): 225-229.
43. Häggblom M.M, Rivera M.D., Young L.Y., (1993). Influence of alternative Electron Acceptors on the Anaerobic Biodegradability of Chlorinated Phenols and Benzoic Acids. *Applied and Environmental Microbiology* 59(4): 1162-1167.
44. Hollender J., Hop J., Dott W. (1997). Degradation of 4-chlorophenol via the *meta* cleavage pathway by *Comamonas testosteroni* JH5. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 4567-4572.
45. Holmes D.A., Harrison B.K., Dolfing J. (1993). Estimation of Gibbs free energies of formation of polychlorinated biphenyls. *Environ. Sci. Technol.* 27:725-731.
46. Ide A., Niki Y., Sakamoto F., Watanabe I. (1972). Decomposition of pentachlorophenol in paddy soil. *Agric. Biol. Chem.* 36: 1937-1944.

47. Irvine R.L., Ketchum Jr. L.J. (1989). Sequencing batch reactors for biological wastewater treatment. *Critical Reviews in Environmental Control* 18(4):225–294.
48. Irvine R.L., Wilderer P.A., Flemming H. (1997). Controlled unsteady state processes and technologies: an overview. *Water Sci. Technol.* 35 (1):1–10.
49. Jokela J.K., Salkinoja-Salonen M. (1992). Molecular weight distributions of organic halogens in bleached kraft pulp mill effluents. *Environ. Sci. Technol.* 26:1190-1197.
50. Keith L.H., Telliard N.A. (1979). ES&T special report: Priority pollutants a perspective view. *Environ Sci Technol* 13: 416-423.
51. Kennedy K.J., Lentz E.M. (2000). Treatment of landfill leachate using sequencing batch and continuous flow upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. *Water Res.* 34 (14):3640–3656.
52. Klecka G.M., Gibson D.T. (1981). Inhibition of catechol 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas putida* by 3-chlorocatechol. *Applied and Environmental Microbiology* 41, 1159-1165.
53. Kohring G.W., Rogers J.E., Wiegel J. (1989). Anaerobic biodegradation of 2,4-dichlorophenol in freshwater lake sediments at different temperatures. *Appl Environ Microbiol* 55: 348-353.
54. Kringstad K.P., Lindström K. (1984). Spent liquors from pulp bleaching. *Environ. Sci. Technol.* 18:236-248.
55. Krumme M.L. and Boyd S.A. (1988). Reductive dechlorination of chlorinated phenols in anaerobic upflow bioreactors. *Water Res.* 22:171–177.
56. Lanthier M., Juteau P., Lépine F., Beudet R., Villemur R. (2005). *Desulfitobacterium hafniense* is present in a high proportion within the biofilms of a high-performance pentachlorophenol-degradating methanogenic fixed-film reactor. *Appl Environ Microbiol.* 71:1058–1065
57. Li J., Xing X.H., Wang B.Z. (2003). Characteristics of phosphorus removal from wastewater by biofilm sequencing batch reactor (SBR). *Biochemical-Engineering-Journal*, 16(3): 279-285.
58. Loehr R.C., Krishnamoorthy R. (1998). Terrestrial bioaccumulation potential of phenolic compounds. *Hazardous Waste and Hazardous Materials* 5:2-9.

59. Mohn W.W y Tiedje, J.M. (1992). Microbial reductive dehalogenation. *Microbiology review* 56:482-507.
60. Madigan M. T., Martinko J. M., Parker J. (2003). *Brock biología de los microorganismos*. 10ª edición, ed Prentice Hall, España, pp 448,540, 573-574, 576-578.
61. Madsen, T. and Aamand, J. (1992). Anaerobic transformation and toxicity of trichlorophenols in a stable enrichment culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 557-561.
62. Majumder P.S., Gupta S.K. (2007). Removal of chlorophenols in sequential anaerobic-aerobic reactors. *Bioresour. Technol.* 98:118-119.
63. Mars A.E., Kasberg T., Kaschabek S.R., Van Agteren M.H., Janssen D.B., Reineke W. (1997). Microbial degradation of chloroaromatics. Use of the meta-cleavage pathway for mineralization of chlorobenzene. *Journal of Bacteriology* 179: 4530:4537.
64. McKague A.B, Kolar M-C., Kringstad K.P. (1989). Nature and properties of some chlorinated, lipophilic, organic compounds in spent liquors from pulp bleaching. *Environ. Sci. Technol.* 23:1126-1129.
65. Monsalvo V.M., Mohedano A.F., Casas J.A, Rodríguez J.J. (2009). Cometabolic biodegradation of 4-chlorophenol by sequencing batch reactors at different temperatures. *Bioresour. Technol.* 100, 4572-4578.
66. Moreno G., Buitron, G. (2004). Influence of the origin of the inoculum and the acclimation strategy on the degradation of 4-chlorophenol. *Bioresour. Tech.* 94: 215-218.
67. Movahedian H., Assadi A., Amin M.M. (2008). Effects of 4-chlorophenol loadings on acclimation of biomass with optimized fixed time sequencing batch reactor. *Iranian J. Environ. Health Sci. Eng.* 5 (4): 225-234.
68. Muyzer G., De Waal E.C., Uitterlinden A.G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and environmental microbiology.* 59: 695-700.
69. Nalbur B.E., Alkan U. (2007). The inhibitory effects of 2-CP and 2,4-DCP containing effluents on sequencing batch reactors. *Int. Biodeter. Biodegr.* 60 (3):178-188.

70. Narasimhan T.R., Mayura K., Clement B.A., Saf<sup>c</sup> S.H., Phillips T.D. (1992). Effects of chlorinated phenols on rat embryonic and hepatic mitochondrial oxidative phosphorylation. *Environmental Toxicology and Chemistry* 805–814.
71. Paasivirta J., Heinola K., Humppi T., Karjalainen A., Knuutinen J., Mäntykoski K., Paukku R., Piilola T., Surma-Aho K., Tarhanen J., Welling L., Vihonen H. Särkkä J. (1985). Polychlorinated phenols, guaiacols and catechols in the environment. *Chemosphere* 14:469-491.
72. Quan, X., Shi, H., Wang, J., Qian, Y., (2003). Biodegradation of 2,4-dichlorophenol in sequencing batch reactors augmented with immobilized mixed culture. *Chemosphere* 50: 1069–1074
73. Rittmann B.E., McCarty P.L. (2001). *Environmental Biotechnology: Principles and Applications*, McGraw-Hill, New York.
74. Reardon K.F., Mosteller D.C., Rogers J.B., DuTeau N.M., Kim K.H. (2002). Biodegradation kinetics of aromatic hydrocarbons mixtures by pure and mixed bacterial cultures. *Environmental Health Perspectives* 110:1005–1011.
75. Reineke W. (2001). Aerobic and anaerobic biodegradation potentials of microorganisms. In: Beek B (Ed) *Handbook of Environmental Chemistry, Vol 2, Part K. Biodegradation and Persistence* (pp 1-161). Springer-Verlag, Berlin.
76. Sahinkaya E., Dilek F.B. (2006). Effect of biogenic substrate concentration on the performance of sequencing batch reactor treating 4-CP and 2,4-DCP mixture. *J. Hazar. Mat.* 128, 258-264.
77. Salkinoja-Salonen M.S., Valo R., Apajalahti J., Hakulinen R., Silakoski L., Jaakkola T. (1984). Biodegradation of chlorophenolic compounds in wastes from wood-processing industry. In: Klug MJ, Reddy CA (Eds) *Current Perspectives in Microbial Ecology. Proc. of the Third International Symposium on Microbial Ecology 7-12 August, 1983* (pp 668-676). American Society for Microbiology, Washington, D.C.
78. Sanford R.A., Cole J.R., Löffler F.E., Tiedje J.M. (1996). Characterization of *Desulfitobacterium chlororespirans* sp. nov. which grows by coupling the oxidation of lactate to the reductive dechlorination of 3-chloro-4-hydroxybenzoate. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:3800–3808.

79. Schmidt E. (1987). Response of a chlorophenols degrading mixed culture to changing loads of phenol, chlorophenol and cresols. *Applied Microbiology and Biotechnology* 27: 94-99.
80. Sekiguchi Y., Kamagata Y., Syutsubo K., Ohashi A., Harada H., Nakamura K. (1998). Phylogenetic diversity of mesophilic and thermophilic granular sludges determined by 16S rRNA gene analysis. *Microbiology* 144: 2655-2665.
81. Shelton D.R., Tiedje J.M. (1984). Isolation and partial characterization of bacteria in an anaerobic consortium that mineralizes 3-chlorobenzoic acid. *Appl. Environ. Microbiol.* 48:840-848.
82. Sirianuntapiboon S., Hongsisuwan T. (2007). Removal of  $Zn^{2+}$  and  $Cu^{2+}$  by a sequencing batch reactor (SBR) system. *Bioresource Technology* 98: 808-818.
83. Smidt H., de Vos W.M. (2004). Anaerobic microbial dehalogenation. *Ann. Rev. Microbiol.* 58:43–73.
84. Stringer R., Johnston P. (2001). *Chlorine and the Environment: An Overview of the Chlorine Industry*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
85. Suflita J.M., Horowitz A., Shelton D.R., Tiedje J.M. (1982). Dehalogenation: A novel pathway for the anaerobic biodegradation of haloaromatic compounds. *Science* 218:1115-1117.
86. Suntio L.R., Shiu W.Y., Mackay D. (1988). A review of the nature and properties of chemicals present in pulp mill effluents. *Chemosphere* 17:1249-1290.
87. Tarighian A., Hill G., Headley J., Pedras S. (2003). Enhancement of 4-chlorophenol biodegradation using glucose. *Clean Technologies and Environmental Policy* 5:61–65.
88. Tartakovsky B., Manuel M.F., Beaumier D., Greer C.W., Guiot S.R. (2001). Enhanced selection of an anaerobic pentachlorophenol-degrading consortium. *Biotechnol. Bioeng.* 73:476–483.
89. Tomei M. C., Annesini M. C., Luberti R., Cento G., Senia A. (2003). Kinetics of 4-nitrophenol biodegradation in a sequencing batch reactor. *Water. Res.* 37: 3803–3814.
90. Utkin I., Dalton D.D., Wiegel J. (1995). Specificity of reductive dehalogenation of substituted ortho-chlorophenols by *Desulfitobacterium dehalogenans* JW/IU-DC1. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:346–351.

91. Wang S.J., Loh K.C. (1999). Facilitation of cometabolic degradation of 4-chlorophenol using glucose as an added growth substrate. *Biodegradation* 10(4): 261–269.
92. Wang S. J., Loh, K. C., Chua S. S. (2003). Prediction of critical cell behaviour of *Pseudomonas putida* to maximize the cometabolism of 4-chlorophenol and sodium glutamate as carbon sources. *Enzyme. Microbial. Tech.* 32: 422–430.
93. Watanabe K., Kodama Y., Syutsubo K., Harayama S. (2000). Molecular characterization of bacterial populations in petroleum-contaminated groundwater discharged from underground crude oil storage cavities. *Applied and environmental microbiology.* 66: 4803-4809.
94. Watson H.M. (1993). A comparison of the effects of two methods of acclimation on aerobic biodegradability. *Environmental Toxicology and Chemistry* 12:2023–2030.
95. Wieser M., Eberspächer J., Vogler B., Lingens, F. (1994). Metabolism of 4-chlorophenol by *Azotobacter* sp. GP1, structure of the *meta* cleavage product of 4-chlorocatechol. *FEMS Microbiology Letters* 116, 73.78.
96. Ye Fen-xia y Sheng D.S. (2004). Acclimation of anaerobic sludge degrading chlorophenols and the biodegradation kinetics during acclimation period. *Chemosphere.* 54: 1573-1580.
97. Zhang X., Wiegel J. (1990). Sequential anaerobic degradation of 2,4-dichlorophenol in freshwater sediments. *Appl Environ Microbiol* 56: 1119-1127.

## 2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

### 2.1 Justificación

El uso indiscriminado de clorofenoles ha generado problemas para la salud y contaminación ambiental. En particular el 2-clorofenol (2CP) es un compuesto orgánico recalcitrante y con una alta toxicidad, por lo tanto es necesario encontrar un sistema que ayude a mejorar su mineralización. Se ha reportado que en condiciones aerobias no se logra una mineralización del 2CP debido a que se presenta la acumulación de intermediarios que pueden llegar a ser tóxicos. En contraste, el 2CP se mineraliza completamente a través de la digestión anaerobia, aunque con bajas velocidades de consumo.

Se ha sugerido que la velocidad de consumo del 2CP se puede mejorar utilizando donadores de electrones externos, así como un periodo de aclimatación de los lodos o la utilización de pequeñas concentraciones de oxígeno, sin embargo, hasta el momento no se ha concluido como influyen éstos en el consumo. Se ha evidenciado que los reactores anaerobios de lote secuenciado (ASBR) pueden mejorar las velocidades de consumo a lo largo de los ciclos de operación en el tratamiento de contaminantes ya que estimulan la aclimatación. Hasta el momento, no existen trabajos relacionados con la mineralización del 2CP mediante digestión anaerobia en este tipo de reactores, por lo que se pretende utilizarlo para obtener una mejor velocidad de consumo, además de la producción de biogás.

Asimismo, todavía no queda claro el efecto y relación de los cambios en la comunidad microbiana sobre el proceso respiratorio del 2CP. Por lo tanto, es importante evaluar la dinámica poblacional del consorcio microbiano por técnicas de biología molecular.

## 2.2 Objetivo

### 2.2.1 Objetivo general

Evaluar la fisiología del proceso respiratorio metanogénico del 2-clorofenol (2CP) en cultivos en lote y en reactores anaerobios de lote secuenciado (ASBR), así como la dinámica poblacional del consorcio microbiano.

### 2.2.2 Objetivos particulares

Evaluar:

- En cultivos en lote:
  1. El uso de lodo metanogénico con diferentes periodos de contacto previo al 2CP.
  2. La adición de un donador de electrones en relación estequiométrica al 2CP.
  3. La presencia de diferentes concentraciones iniciales de oxígeno.
  
- En reactores anaerobios de lote secuenciado (ASBR):
  1. El efecto de fenol como donador de electrones en el proceso respiratorio.
  2. La sedimentabilidad del lodo mediante el índice volumétrico (IVL) y sustancias exopoliméricas (SEP).
  3. La dinámica de las poblaciones microbianas participantes en la eliminación del 2CP.

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

En este capítulo se describe el diseño experimental y los métodos analíticos para la evaluación del proceso respiratorio metanogénico del 2-Clorofenol (2CP), en cultivos en lote y en el reactor anaerobio de lote secuenciado (ASBR). Asimismo, se describen los métodos de biología molecular necesarios para la evaluación de la dinámica de la comunidad microbiana en el reactor ASBR.

### 3.1 Materiales

#### 3.1.1 Reactor continuo y fuente de inóculo

Se instaló un reactor UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket), elaborado de vidrio con un volumen de operación de 1420 mL. El reactor fue alimentado en continuo por medio de una bomba peristáltica con manguera tygon. El biogás generado por el reactor fue separado por una campana de liquido-biogás-biomasa recolectado y llevado por medio de una manguera de silicón para su cuantificación a una columna de desplazamiento que contenía una solución de 300 mg de NaCl/L con un pH de 2 y con rojo de metilo como indicador. El reactor se inoculó con un lodo granular proveniente de una planta de tratamiento de agua residual de una industria cervecera (Central de Malta) en el estado de Puebla, el cual contenía 17.52 g SSV/L. La composición del influente fue la siguiente (g/L):  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (0.703),  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (0.028),  $\text{MgSO}_4$  (0.111),  $\text{CaCl}_2$  (0.1), NaCl (0.297), KCl (0.5) y 1 mL/L de los siguientes elementos traza (mg/L) :  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (2),  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (0.786),  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  (0.1),  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (0.05),  $\text{ZnCl}_2$  (0.05),  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$  (0.05),  $\text{AlCl}_3$  (0.05),  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (0.05),  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (0.07),  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0.05) y 0.05 mL/L de HCl concentrado. Las condiciones de operación del reactor en continuo fueron: TRH 2 días, temperatura de  $32 \pm 0.5^\circ\text{C}$ , flujo de alimentación 0.49 mL/min y una velocidad de carga de 146 mg de C-acetato/L·d (380 mg acetato/L·d). Bajo estas condiciones experimentales se determinaron, la concentración de carbono en el influente y efluente, así como la producción de biogás. El estado estacionario de los lodos fue considerado cuando las variaciones de estos datos fueron menores que 10%.

### 3.1.2 Cultivos en lote

Los ensayos cinéticos se llevaron a cabo en botellas serológicas de 60 mL por duplicado. Cada botella fue utilizada como una unidad experimental independiente, es decir, después de tomar muestra cada botella fue descartada. Las botellas fueron inoculadas con una concentración de  $3.5 \pm 0.21$  g SSV/L, a estas se les adicionó 2CP para obtener una concentración inicial de 28 mg C-2CP/L. Las botellas fueron selladas con tapones de goma y aros de aluminio. El oxígeno molecular fue desplazado con una corriente de nitrógeno por 5 min. Se utilizaron controles los cuales contenían lodo metanogénico sin la presencia de 2CP. Las botellas fueron incubadas a 35°C, pH 7 y sin agitación. El tiempo de experimentación fue dependiente de cada experimento.

#### 3.1.2.1 Evaluación de contacto previo al 2CP

Los ensayos se llevaron a cabo en botellas serológicas de la manera descrita en el apartado 3.1.2. El inóculo se evaluó con tres tiempos de contacto previo 0, 50 y 80 días, el parámetro de la elección del tiempo fue una vez que alcanzaron un valor mayor que 90% en las eficiencias de consumo. El inóculo, que representó el ensayo con 0 d de contacto previo, se obtuvo del lodo proveniente del reactor UASB (sección 3.1.1). Una vez que la eficiencia de consumo fue mayor que 80%, el sobrenadante fue removido y la botella fue realimentada con nuevo medio mineral y con 28 mg C-2CP/L. Este nuevo ensayo cinético correspondió a la evaluación de 50 días de contacto previo. Una vez que se alcanzó una eficiencia de consumo mayor que 80%, se repitió el procedimiento de remoción de sobrenadante y adición de medio mineral con 28 mg C-2CP/L, este ensayo cinético correspondió a 80 días de contacto previo.

#### 3.1.2.2 Donadores de electrones

Los ensayos se llevaron a cabo de la misma forma descrita previamente (sección 3.1.2). Se utilizó como inóculo lodo con 80 días de contacto previo al 2CP. El fenol y acetato fueron evaluados como donadores de electrones para el consumo de 2CP. Estos se adicionaron en relación estequiométrica con el 2CP.

### 3.1.2.3 Adición de oxígeno

Los ensayos se llevaron a cabo en botellas serológicas de 60 mL con la metodología descrita previamente. Una vez que el oxígeno fue eliminado de las botellas serológicas con nitrógeno, se inyectaron diferentes volúmenes de aire (0.6, 1.2, 1.9, 2.5 mL), los cuales corresponden a 0.5, 1.0, 1.5 and 2 mg O<sub>2</sub>/L, respectivamente. Con estas concentraciones se evaluó el efecto de cuatro concentraciones iniciales de oxígeno en la metanización y mineralización de 28 mg C-2CP/L. En este experimento se evaluaron dos inóculos (con 0 y 80 días de contacto previo al 2CP).

### 3.1.3 Ensayos cinéticos en reactores anaerobios de lote secuenciado (ASBR)

Se retiraron 400 mL (8 gSSV/L) del lodo metanogénico de reactor UASB (sección 3.1.1). El lodo retirado fue lavado tres veces con solución salina y se colocó en un matraz con medio mineral, en presencia de 28 mg C-2CP/L a 32°C y sin agitación. Después de 50 días de contacto y cuando la eficiencia de consumo del 2CP fue mayor que 95%, el lodo fue lavado y utilizado para inocular los dos reactores SBR. Los dos reactores (ASBR<sub>A</sub> y ASBR<sub>B</sub>) se inocularon con 3.5±0.21 g SSV/L de lodo metanogénico, con un volumen de operación de 1.3 L. Los reactores fueron incubados a 32±2°C, pH 7 (valor inicial), atmósfera de nitrógeno y agitados a 100 rpm. Se utilizó una bomba peristáltica para alimentar el influente, tomar muestra y descargar el efluente. El ciclo de los reactores fue definido de la siguiente forma: alimentación 15 min; reacción variable (tiempo requerido para obtener una  $E_{2CP} \geq 90\%$ ), sedimentación 2 h y drenado de 15 min. El reactor ASBR<sub>A</sub> fue alimentado con diferentes concentraciones de 2CP y el reactor ASBR<sub>B</sub> con una mezcla de 2CP y fenol como donador de electrones (tabla 3.1). Cuando las velocidades específicas de consumo de 2CP fueron constantes, se incrementaron las concentraciones de los sustratos, esto sucedió cada 3 o 5 ciclos de operación en cada concentración. Se tomaron muestras en cada ciclo de operación para: i) la evaluación del proceso respiratorio, ii) la sedimentabilidad del lodo y iii) la dinámica poblacional.

**Tabla 3.1. Concentraciones de 2CP y Fenol utilizadas en los reactores ASBR.**

No. de ciclo	ASBR <sub>A</sub>		ASBR <sub>B</sub>	
	mg C-2CP/L	mg C-2CP/L	mg C-2CP/L	mg C-Fenol/L
1-5	28	28	28	28
6-10	42	42	42	42
11-13	56	56	56	56
14-18	84	84	84	84
19-21	112	112	112	112
22-26	140	140	140	140
27-29	196	196	196	196

### 3.1.3.1 Pruebas abióticas de volatilidad y adsorción con el 2CP en el ASBR

Las pruebas abióticas se realizaron en el reactor ASBR con el fin de verificar las posibles pérdidas del 2CP por volatilización y adsorción en el lodo. Los ensayos se efectuaron con una concentración de 84 mg 2CP-C/L por un periodo de 20 días, bajo las condiciones descritas anteriormente (sección 3.1.3). La volatilización se llevó a cabo con medio mineral y 2CP sin la presencia de inóculo. La prueba de adsorción se realizó con medio mineral, 2CP y lodo esterilizado por 3 h. Las pérdidas por volatilización y adsorción se calcularon como la diferencia entre la concentración final e inicial de 2CP medida en la fase líquida.

## 3.2 Métodos analíticos

### 3.2.1 Cuantificación de 2CP y fenol

La identificación de 2CP y fenol se determinó por cromatografía de líquidos a alta presión (HPLC, Waters 2996) utilizando un detector de arreglo de diodos, con una columna C18 fase reversa (5 $\mu$ , 250 mm X 4.6 mm, phenomenex, Torrance, CA, USA). La fase móvil fue acetonitrilo/agua (50:50 v/v) a un flujo de 1 mL/min.

Se prepararon estándares de 2-clorofenol y fenol. El volumen de inyección fue de 20  $\mu$ L de la muestra filtrada con membrana de nitrocelulosa de 0.22  $\mu$ m GSWP y 13 mm de diámetro. Cada muestra se midió por triplicado. A partir de las curvas resultantes, se determinaron las

concentraciones no conocidas de 2-clorofenol y fenol de cada una de las muestras. En la tabla 3.2 se presentan los resultados de las curvas estándar, los cuales muestran la reproducibilidad del método, con coeficientes de variación menores que 10%.

**Tabla 3.2. Parámetros de curvas estándar de 2CP y fenol.**

Compuesto	Pendiente	Ordenada al origen	Coefficiente de determinación ( $R^2$ )
2CP	9726.9±543	111128±42947	0.9965±0.0022
Fenol	8410±324	2580.5±2353	0.993±0.0031

### 3.2.2 Determinación de biogás

La composición de biogás ( $CH_4$  y  $CO_2$ ) fue determinada en un cromatógrafo de gases HP-3850 con un detector de conductividad térmica (TCD). El gas acarreador fue helio con un flujo de 25 mL/min, con temperaturas de, columna 100°C, inyector 50°C y detector 100°C. La medición del biogás se basó en la ley de los gases ideales, en donde, 1 mol de gas a 1 atm y 273°K ocupa 22.4 L. El volumen de gas generado se ajustó a condiciones estándar de presión y temperatura, tomando 0.8 atm de presión atmosférica y 35°C de temperatura. Para realizar la curva de calibración, se prepararon estándares de  $CH_4$  y  $CO_2$  en el reactor SBR, la mezcla de gases ocupó 300 mL correspondientes al espacio de cabeza. Esta curva se realizó por triplicado y se hizo desde 0 a 300 mg/L de metano y dióxido de carbono. En la tabla 3.3 se presentan los resultados de las curvas estándar, los cuales muestran la reproducibilidad del método, con coeficientes de variación menores que 10%.

**Tabla 3.3 Parámetros de curvas estándar de  $CH_4$  y  $CO_2$ .**

Compuesto	Pendiente	Ordenada al origen	Coefficiente de determinación ( $R^2$ )
$CH_4$	45.992±8.6	96.761±12.3	0.9971±0.0022
$CO_2$	14.608±3.2	120.23±12.3	0.9958±0.0021

### 3.2.3 Determinación de carbono total y carbono inorgánico por TOC.

La cuantificación de carbono total (CT) e inorgánico (CI) se realizó por medio de un analizador de carbono orgánico total TOC-5000 (Shimadzu). El equipo se encarga de analizar por separado el carbono total e inorgánico.

Para la preparación de la curva estándar de carbono total se pesaron 2.125 g de Biftalato de potasio en un litro de agua desionizada para evitar interferencia, esto equivale a 1000 mg de C/L, a partir de ésta se hicieron disoluciones en un intervalo de concentración de (0-100 mg C/L). Para la preparación de la curva de carbono inorgánico se pesaron 3.5 g de bicarbonato de sodio y 4.41 g de carbonato de sodio en un litro de agua desionizada, esto equivale a 1000 mg de C/L, de ésta se prepararon concentraciones de 0-100 mg/L. En la tabla 3.4 se presentan los resultados de las curvas estándar, los cuales muestran la reproducibilidad del método, con coeficientes de variación menores que 10%.

**Tabla 3.4 Parámetros de curvas estándar de CT y CI.**

Compuesto	Pendiente	Ordenada al origen	Coefficiente de determinación ( $R^2$ )
CT	81.135±10.6	1843.4±124.3	0.9978±0.0022
CI	64.043±12.2	1401.5±145.3	0.9951±0.0021

### 3.2.4 Determinación de ácidos grasos volátiles (AGV)

La cuantificación de AGV se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases HP-5890 series II con detector de ionización de flama (FID), con una columna AT-1000 (0.53 mm x 1.2 mm x 10 m), operando a temperaturas de 120°C para el horno, 130°C para el inyector y 150°C para el detector, utilizando nitrógeno como gas acarreador a un flujo de 6.6 mL/min.

Se elaboraron curvas estándar de AGV. Se preparó una solución madre de los compuestos en mezcla a una concentración de 1000 mg L<sup>-1</sup>, haciendo diluciones para tener intervalos de concentración de 50 a 1000 mg L<sup>-1</sup> para cada uno. Se prepararon viales de inyección con 950 µL de muestra y 50 µL de HCl al 50% como medio acidificante. El programa para la determinación de los compuestos fue el siguiente: temperatura inicial de 50 °C, temperatura

final de 120 °C, una rampa de temperatura de 10 °C por minuto y un tiempo de análisis de 5.95 minutos.

Para la estandarización del método, se cuantificaron los compuestos en mezcla y por triplicado. En la tabla 3.5 se presenta los resultados de las curvas estándar. Al evaluar la reproducibilidad del método, se obtuvieron coeficientes de variación menores que 10%, para cada compuesto.

**Tabla 3.5 Parámetros de curvas estándar de AGV.**

Compuesto	Pendiente	Ordenada al origen	Coefficiente de determinación (R <sup>2</sup> )
Acetato	238.42±14.2	15170±132.3	0.9936±0.0022
Propionato	314.35±34.7	20869±135.7	0.9941±0.0011
Butirato	306.03±23.4	29289±155.8	0.9891±0.0021
Valerato	329.75±34.3	20444±123.3	0.9988±0.0032

### 3.2.5 Índice volumétrico del lodo (IVL)

El IVL se define como el volumen que ocupa 1 g de lodo después de 30 min. Se realizó una modificación al método reportado en el manual Standard Methods (APHA, 1998). Se determinó el IVL<sub>0.1</sub> que se refiere al valor calculado a partir de una muestra de 100 mL en lugar del calculado a partir de una muestra de 1 L. La muestra de lodos (100 mL), fue vertida al cilindro graduado, después de 30 min se leyó el volumen que ocuparon los lodos. Posteriormente el IVL<sub>0.1</sub> se cálculo de la siguiente manera.

$$IVL_{0.1} \text{ (mL/g)} = VS_{30} / (VM)(SST)$$

Donde:

IVL<sub>0.1</sub> = índice volumétrico de lodos medido en 0.1 L de muestra (mL/g)

VS<sub>30</sub> = volumen de lodo sedimentado en 30 min (mL)

VM = volumen de la muestra (L)

SST = sólidos suspendidos totales (g/L)

### 3.2.6 Extracción de sustancias exopoliméricas (SEP)

La extracción de las SEP contenidas en los lodos, se realizó disgregando los gránulos del lodo con una solución de EDTA 0.1 M y 10 min de agitación, según lo reportado por Martínez et al. (2004). Una centrifugación posterior permite separar el paquete celular del sobrenadante en el que se encuentran las SEP. Son diversas las sustancias que se pueden encontrar componiendo las SEP, como son las proteínas y carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos y húmicos, entre otros. En este trabajo solo se cuantificaron las proteínas y carbohidratos exopoliméricos.

#### 3.2.6.1 Cuantificación de carbohidratos y proteínas

Los carbohidratos exopoliméricos fueron determinados mediante el método colorimétrico de Dubois (1956), el cual utiliza fenol, sulfato de hidracina y ácido sulfúrico como mezcla de digestión. Se empleó como referencia una curva estándar de 0-100 mg glucosa/L. Las muestras se cuantificaron a una longitud de onda de 490 nm.

El contenido de proteína exopolimérica se cuantificó utilizando el método colorimétrico de Lowry (1951). Como referencia se utilizó una curva estándar de 0 a 300 mg de albumina/L. A fin de eliminar la interferencia producida por el EDTA para el método de Lowry, las muestras fueron sometidas previamente a diálisis durante dos días a 4°C, utilizando una membrana con un tamaño de corte de 10KD (Espectra/por#6).

En la tabla 3.6 se presenta los resultados de las curvas estándar de carbohidratos y proteínas. Al evaluar la reproducibilidad del método, se obtuvieron coeficientes de variación menores que 10%, para cada compuesto.

**Tabla 3.6. Parámetros de curvas estándar de carbohidratos y proteínas.**

Compuesto	Pendiente	Ordenada al origen	Coefficiente de determinación ( $R^2$ )
Carbohidratos	0.0154±0.001	0.0824±0.002	0.99±0.0012
Proteínas	0.0029±0.001	0.047±0.03	0.9907±0.0017

### 3.3 Métodos moleculares

La diversidad de las comunidades de bacterias y archaeas presentes en ambos reactores (ASBR<sub>A</sub> y ASBR<sub>B</sub>) se determinó mediante el método de electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE) y métodos de secuenciación.

#### 3.3.1. Extracción del DNA y amplificación del gen 16S r RNA

En el último ciclo de operación a cada concentración evaluada, se tomaron muestras por duplicado de 0.5 g de lodo de los reactores ASBR<sub>A</sub> y ASBR<sub>B</sub>. Las muestras fueron centrifugadas a 14,000 rpm por 10 minutos y congeladas a -20 °C hasta la extracción del DNA.

La extracción se realizó con el kit de extracción UltraClean™ Soil DNA Isolation (MO BIO Laboratories, Carlsbad, CA, USA), verificando la cantidad y rendimiento del DNA, por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 2% (p/v) a 90 voltios (V) por 1 hora.

La región V2-V3 de los genes de arqueas del 16S rRNA fue amplificada usando los iniciadores A109(T)-f(5'-ACTGCTCAGTAACACGT-3') y 515r(5'ATCGTATTACCGCGGCTGCTGCTGGCAC-3') con grapa (Grosskopf et al., 1998), con el siguiente programa: pre-desnaturalización a 95 °C por 5 min, 35 ciclos con una desnaturización a 95 °C por 30 seg (desnaturización), una hibridación a 53 °C por 40 seg y una elongación a 72 °C por 1 min, y una post-elongación a 72 °C por 7 min (García-Saucedo y et al., 2008).

La región V6-V8 de genes bacterianos del rRNA 16S fue amplificada usando los iniciadores bacterianos 968-f(5'-GAACGCGAAGAACCCTTACC-3') con grapa y 1401-r(5'-CGGTGTGTACAAGACCC-3') (Nübel y et al., 1996). con el siguiente programa: pre-desnaturalización a 94 °C por 2 min, 30 ciclos con una desnaturización a 94 °C por 45 seg, una hibridación a 60 °C por 30 seg y una elongación a 72 °C por 1.5 min, y una post-elongación a 72 °C por 10 min (García-Saucedo et al. 2008). La grapa utilizada para DGGE consistió en una secuencia de 40 pb (5'-CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGGCA CGGGGGG-3'). La PCR se realizó en un termociclador CG1-96 (Corbett Research, Sydney, Australia), la mezcla de reacción para la PCR consistió en (μL): 2.5 de cada primer (20 mM), 1 mezcla de nucleótidos (10 mM por nucleótido), 10 de amortiguador (10X), 5 de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0.5 de Taq DNA polimerasa (5u/μL), 1 de ADN del lodo y 27.5 agua estéril.

### 3.3.2 Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE)

Los productos de amplificación fueron separados por DGGE en un DCode universal mutation detection system (Bio-RAD Laboratories, Hercules, USA) a 60 °C, inicialmente se aplicaron 200 V durante 5 minutos y posteriormente a 85V durante 16 horas, de acuerdo al procedimiento descrito por García-Saucedo et al., (2008), utilizando geles de poliacrilamida al 6% (p/v) y un gradiente desnaturalizante de 42 a 58% y de 38 a 53% para arquea y bacteria, respectivamente. Los geles de DGGE fueron teñidos con nitrato de plata y escaneados mediante un fotodocumentador Epichemi3 Darkroom (UVP Bioluminescence Systems, Upland, CA).

### 3.3.3 Purificación y secuenciación de las bandas de 16S rDNA

Las bandas más representativas del gel de DGGE fueron cortadas y reamplificadas usando los iniciadores mencionados anteriormente. Los productos de PCR fueron purificados (Wizard® SV gel and PCR clean-up system, Promega, Madison, WI, USA), visualizados por electroforesis en gel de agarosa y secuenciados usando ABI Prism Big-Dye Terminator 3.1 Ready Reaction Cycle Sequencing en un secuenciador ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Warrington, UK). Las secuencias de ADN fueron analizadas usando los programas Chromas (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>) y BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). La afiliación filogenética de las secuencias parciales fue estimada usando el programa Basic Local Alignment Search Tool BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) (McGinnis & Madden, 2004). Los árboles filogenéticos de las secuencias del gen para el ARNr 16S de las bandas del gel de DGGE (posiciones de Escherichia coli 110 a 482 y 969 a 1367) fueron construidos usando el método de neighbor-joining por medio del software MEGA4 (<http://www.megasoftware.net>) (Tamura et al., 2007).

### 3.4 Cálculo de índices ecológicos

Los índices ecológicos se calcularon a partir de las bandas del gel obtenido por DGGE. Cada banda dentro de un carril fue considerada como un fragmento de una población diferente, mientras que las bandas con migración similar dentro de los diferentes carriles fueron consideradas como fragmentos de una misma población. La relación entre la superficie de la banda y la intensidad media en píxeles de dicha superficie fue considerada como la intensidad de la banda y fue calculada usando un programa analizador de imágenes (Image J), desarrollado por the National Institutes of Health (Martínez et al., 2009).

Los índices ecológicos de diversidad (H) y equitatividad (J) fueron derivados de la siguiente ecuación  $H = - \sum P_i \ln P_i$  y  $J = H/\ln S$ . El término  $P_i$  se refiere a la abundancia relativa de la banda en un carril y fue calculado como sigue:  $P_i = n_i/N$ , donde  $n_i$ , es la intensidad de una banda individual y  $N$  es la suma de intensidades de las bandas en un carril.  $S$  representa el número total de bandas en la muestra (Martínez et al., 2009).

### 3.5 Cálculo de variables de respuesta

Los cultivos de los reactores fueron evaluados a través del cálculo de variables de respuesta.

La eficiencia de consumo fue calculada como sigue:

$$E(\%) = \left( \frac{\text{mg sustrato consumido}}{\text{mg sustrato alimentado}} \right) * 100$$

Los rendimientos de producción de biogás:

$$Y_{P/S} = \frac{\text{mg producto formado}}{\text{mg sustrato consumido}}$$

La velocidad específica de consumo de sustrato se calculó utilizando la ecuación:

$$q_s = \frac{dS}{dt} \times \frac{1}{X}$$

En donde  $S$  es la concentración de sustrato (mg/L),  $t$  es el tiempo (d), y  $X$  es la concentración de biomasa del cultivo (mg SSV/L). La pendiente de los valores obtenidos durante la fase de consumo lineal representan los valores de  $q_s$ , según lo informado por Elmen et al. (1997). Ver anexo 1.

### 3.6 Referencias

1. Dubois M., Illes K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350–356.
2. Elmen J., Pan W., Leung S.Y., Magyarosy A., Keasling J.D. (1997). Kinetics of toluene degradation by a nitrate-reducing bacterium isolated from a groundwater aquifer. *Biotechnol. Bioengineering* 55, 82-90.
3. García-Saucedo C., Fernández F.J., Buitrón G., Cuervo-López F.M., Gómez J. (2008). Effect of loading rate on TOC consumption efficiency in a sulfate reducing process: sulfide effect in batch culture. *Journal of chemical technology and biotechnology.* 83(12): 1648,1657.
4. Grosskopf R., Janssen P.H., Liesack W. (1998). Diversity and structure of the methanogenic community in anoxic rice paddy soil microcosms as examined by cultivation and direct 16S rRNA gene sequence retrieval. *Applied and environmental microbiology.* 64: 960,969.
5. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
6. Martínez O., Lema J., Mendez R., Cuervo-López F., and Gomez J. (2004). Role of exopolymeric protein on the settleability of nitrifying sludges. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 87, 177-187.
7. Martinez-Hernandez S., Olguin E., Gómez J., Cuervo-López F. (2009). Acetate enhances the specific consumption rate of toluene under denitrifying conditions. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 57:679-687.
8. McGinnis S., Madden T.L. (2004). BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. *Nucleic acids research.* 32: 20, 25.
9. Nübel U., Engelen B., Felske A., Snaidr J., Wieshuber A., Amann R.I., Ludwig W. Backhaus H. (1996). Sequence heterogeneities of genes encoding 16 rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *Journal of bacteriology.* 178:5636, 5643.

10. Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. (2007). MEGA 4, Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software version 4.0. *Molecular biology and evolution*. 24: 1595-1599.
11. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. (1998). 20th edn, American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington DC, USA.

## 4. METANIZACIÓN Y MINERALIZACIÓN DEL 2-CLOROFENOL (2CP) EN CULTIVOS EN LOTE POR DIGESTIÓN ANAEROBIA

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos durante la biodegradación del 2-clorofenol (2CP) en cultivos por lote. Este capítulo está publicado en la revista *Water Science and Technology*.

Beristain-Montiel L., Gómez-Hernández J., Monroy-Hermosillo O., Cuervo-López F., Ramírez-Vives F. (2010). Methanization and mineralization of 2-chlorophenol by anaerobic digestion. *Water Sci. Technol.* 62:1791–1798.

El estudio se enfocó en evaluar en cultivos en lote, i) el efecto de utilizar como inóculo lodo metanogénico con diferentes periodos de contacto previo al 2CP, ii) la adición de acetato y fenol como donador de electrones en relación estequiométrica con el 2CP, iii) el efecto de la presencia de diferentes concentraciones iniciales de oxígeno. Al evaluar los diferentes tiempos de contacto previo al 2CP (0, 50 y 80 días), se observaron diferencias en la fase de retardo teniendo hasta una reducción del 62.5% con 80 días de contacto previo. Además, se presentó un incremento en las velocidades específicas de consumo de 2CP del 57 y 114% a 50 y 80 días respectivamente, en comparación con el control (0 días). En contraste, no se observaron diferencias significativas en los valores de rendimientos de producción de biogás ( $YC\text{-biogas}/C\text{-2CP} = 0.7 \pm 0.12$ ) y eficiencias de consumo ( $E_{2CP} = 84\%$ ). Los experimentos para la evaluación de donadores de electrones se llevaron a cabo con un inóculo con un periodo de contacto previo al 2CP de 80 días. En los ensayos con acetato como donador de electrones no se observaron variaciones en los valores de rendimientos de producción de biogás, eficiencia de consumo de sustrato y velocidad específica de consumo de 2CP. Sin embargo, con fenol como donador de electrones, se observó un incremento significativo en la velocidad específica de consumo de 2CP de 0.003 a 0.0044 mg C-2CP/g SSV·d con respecto al control. Con respecto a la adición de diferentes concentraciones iniciales de

oxígeno, se ha reportado que la adición de oxígeno en cultivos metanogénicos puede incrementar el consumo de compuestos recalcitrantes. Sin embargo, en nuestros resultados no observamos diferencias en los valores de eficiencias y velocidades específicas de consumo de 2CP durante todas las concentraciones de oxígeno evaluadas (0, 0.5, 1, 1.5, 2 mg O<sub>2</sub>/L). Los rendimientos de producción de metano disminuyeron de forma constante hasta un 50% y la producción de fenol disminuyó hasta un 42% con 2 mg O<sub>2</sub>/L. Se observó un incremento en la velocidad específica de consumo y disminución en la fase lag al utilizar un lodo con 80 días de contacto previo al 2CP, sin embargo, es probable que este incremento sea por el tiempo de contacto previo y no por la adición de oxígeno.

## Methanization and mineralization of 2-chlorophenol by anaerobic digestion

Lizeth Beristain-Montiel, Jorge Gómez-Hernández,  
Oscar Monroy-Hermosillo, Flor de María Cuervo-López  
and Florina Ramírez-Vives

### ABSTRACT

The aim of this study is to contribute to the knowledge about 2-Chlorophenol (2CP) mineralization and methanization in batch culture. This work was focused on evaluating the effect of: (i) the use of sludge with different periods of previous contact to 2CP, (ii) the electron donor addition in stoichiometric relation with 2CP and (iii) the presence of different initial oxygen concentrations. When compared with the control, 50 and 80 days of previous contact to 2CP resulted in a lag phase reduction of 57% and an increase in 2CP specific consumption rate ( $q_{2CP}$ ) of 114%. These results were obtained with no addition of an external electron donor. When acetate was used as an electron donor its consumption resulted independently of 2CP consumption. No lag phase and increase of 46% in  $q_{2CP}$  was observed when phenol was used as an electron donor. In the third part when sludge without previous contact to 2CP was used, it was found that consumption efficiency ( $E_{2CP}$ ) and  $q_{2CP}$  values did not increase in the presence of different oxygen concentrations. However, at the highest oxygen concentration,  $CH_4$  yield ( $Y_{CH_4-C/2CP-C}$ ) and phenol yield ( $Y_{phenol-C/2CP-C}$ ) values decreased, while  $CO_2$  yield value ( $Y_{CO_2-C/2CP-C}$ ) increased with regard to the methanogenic control. The use of sludge previously exposed to both 2CP and  $O_2$  resulted in an increase in  $q_{2CP}$  of 73%. However, among the different oxygen concentrations, no significant difference in  $E_{2CP}$  or  $q_{2CP}$  values was observed when compared to the control without oxygen. Therefore, previous contact to 2CP resulted in being a key factor for improving 2CP mineralization and methanization in batch culture.

**Key words** | 2-Chlorophenol (2-CP), electron donors, methanogenesis, sludge acclimation

Lizeth Beristain-Montiel  
Jorge Gómez-Hernández  
Oscar Monroy-Hermosillo  
Flor de María Cuervo-López  
Florina Ramírez-Vives (corresponding author)  
Departamento de Biotecnología,  
Universidad Autónoma Metropolitana-iztapalapa,  
Av. San Rafael Atlixco 186, Vicentina,  
C.P. 09340 México D.F.,  
México  
E-mail: frav@xanum.uam.mx

### INTRODUCTION

Chlorophenols, very toxic organic compounds, are widely distributed in air, soil, water and in many industrial wastewaters (Monsalvo *et al.* 2009). Chlorophenols are used for wood preservation; manufacturing herbicides, insecticides and fungicides, resulting in its accumulation. Monochloride compounds as 2-chlorophenol (2CP) are also accumulated in superficial and underground water (Manimekalai & Swaminathan 2000). As these compounds are carcinogenic and mutagenic, exposure to them causes cell damage (Nalbur & Alkan 2007). Therefore they are

doi: 10.2166/wst.2010.461

included in the list of organic pollutants with a high priority for elimination (EPA).

Biological treatments have been used to eliminate chlorophenols (Sahinkaya & Dilek 2006). It has been reported that aerobic biodegradation of chlorophenols proceeds by chlorocatechol formation and their final conversion to  $CO_2$  (Bhatt *et al.* 2007). However, 2CP elimination under aerobic conditions results, in most cases, in 3-chlorocatechol accumulation due to the inactivation of 2,3-dioxygenase enzyme (Mars *et al.* 1997). Therefore, total

2CP elimination has not been achieved (Farrell & Bridge 1999). Under anaerobic conditions, particularly in methanogenesis, chlorophenols are eliminated by means of reductive dechlorination followed by aromatic ring cleavage and their final conversion to CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> (Basu *et al.* 1996; Becker *et al.* 1999). Nevertheless, under this condition 2CP specific consumption rate values appear to be an important limiting factor. In order to overcome this situation several actions have been proposed: addition of an electron donor (Basu *et al.* 1996; Parker *et al.* 1993); the use of acclimated sludge (Buitrón *et al.* 1998); aerobic-anaerobic reactors set up (Majumber & Gupta 2007) and the use of microaerophilic or partially aerated conditions (Garibay *et al.* 2005). However, in most of the cases, scarce information about mass balances, 2CP conversion and kinetic data has been included. Therefore, the objective of this work was to evaluate in batch culture the effect of three factors on the specific consumption rate and methanization of 2CP: (i) the use of sludge with different periods of previous contact to 2CP when no external electron donor is added (ii) the electron donor addition in stoichiometric relation with 2CP and (iii) the presence of different initial oxygen concentrations.

## MATERIALS AND METHODS

### Continuous reactor, influent composition and inoculum source

An UASB reactor of 1.4 L work volume inoculated with 0.42 L of anaerobic sludge collected from a brewing factory (17.52 g VSS/L) was set up. Influent composition was as follows (g/L): NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.703), NH<sub>4</sub>Cl (0.028), MgSO<sub>4</sub> (0.111), CaCl<sub>2</sub> (0.1), NaCl (0.297), KCl (0.5) and 1 ml/L of the following trace compounds solution (mg/L) was also added: FeCl<sub>2</sub> 4H<sub>2</sub>O (2), MnCl<sub>2</sub> 4H<sub>2</sub>O (0.786), Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> (0.1), H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (0.05), ZnCl<sub>2</sub> (0.05), (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> (0.05), AlCl<sub>3</sub> (0.05), NiCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O (0.05), CoCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O (0.07), CuCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O (0.05) and 0.05 ml/L of concentrated HCl was added. This mineral medium was also used for batch assays. The UASB reactor operated at a hydraulic retention time (HRT) of 2 days at 32 ± 0.5°C. The reactor was fed with 146 mg acetate-C/L.d. Once the sludge was in

methanogenic steady state it was used as the inoculum for batch assays. Sludge was withdrawn from the UASB reactor previous to each batch assay and washed three times with saline solution (NaCl 0.9%).

### Culture conditions

The kinetic assays were carried out by duplicate in serologic bottles of 60 ml capacity. Each bottle was an independent experimental unit and after sampling was discarded. 40 ml of culture medium supplemented with 28 mg 2CP-C/L was placed in each bottle. The bottles were seeded obtaining a final concentration of 3.5 ± 0.21 g VSS/L and a headspace volume of 20 ml. The bottles were sealed with a rubber plug and an aluminium hoop. The molecular oxygen was displaced by using a current of nitrogen for 5 minutes. A control assay containing the culture medium, methanogenic sludge and no 2CP was conducted in all cases. The bottles were incubated at 35°C, pH 7 and no agitation. The total experimental time ranged from 25 to 40 days depending on the treatment. Carbon mineralization from 2CP to CO<sub>2</sub> was measured as the amount of CO<sub>2</sub> and HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> produced. Methanization of 2CP was measured as CH<sub>4</sub> formation.

### Abiotic assays

Abiotic assays to verify possible losses of 2CP by volatilization or adsorption in the sludge were conducted. The assays were carried out in serologic bottles of 60 ml in the same way as described in the culture conditions. To assess 2CP volatilization no sludge was added while sterilized sludge was used to assess 2CP adsorption. The bottles were incubated at 35°C during 15 days. 2CP concentration was measured in liquid phase. Volatilization and adsorption was calculated by the difference between initial and final 2CP concentration.

### Previous contact to 2CP evaluation

The assays were carried out in serologic bottles of 60 ml in the same way as previously described. Kinetics were performed with 28 mg of 2CP-C/L. No external electron donor was added to the cultures. Sludge with three contact times was evaluated 0, 50 and 80 days as follows. 0 d assays

were conducted with fresh sludge obtained from the UASB reactor fed with acetate with no previous contact to 2CP. Once the 2CP-C consumption efficiency value was  $\geq 80\%$ , the supernatant was removed, the sludge was refilled with new mineral medium supplemented with 28 mg of 2CP-C/L and a new kinetic assay was conducted. This condition was achieved in 50 days, thus this assay corresponded to 50 d of previous contact to 2CP evaluation. This procedure was repeated again in order to evaluate the 80 d previous contact to 2CP, as E value  $\geq 80\%$  was achieved within this time.

#### Electron donors

These assays were conducted in the same way as previously described using sludge with 80 days of contact to 2CP. Acetate (an easily consumable substrate) and phenol (a recalcitrant compound which is also an intermediate in the metabolic route of 2CP), were assessed as electron donors during 2CP consumption. They were supplemented in stoichiometric ratio to 2CP.

#### Oxygen addition

The assays were carried out in serologic bottles of 60 ml in the same way as previously described. Once the oxygen was eliminated from the serologic bottles with nitrogen, different volumes of air (extra dry compressed air, Praxair, Mexico) were injected (0.6, 1.2, 1.9, 2.5 ml) using gas chromatography syringes (Pressure-Lok, 10MAX-HASV, Hamilton, Nevada, USA) in order to obtain the corresponding oxygen concentrations of 0.5, 1.0, 1.5 and 2 mg  $O_2/L$  respectively. The effect of these four initial oxygen concentrations was evaluated on 2CP mineralization and methanization. Two series of assays were conducted and fresh sludge and sludge with 80 days of previous contact to 2CP were used as inoculums.

#### Evaluation of respiratory behavior

Carbon mineralization from acetate, phenol and 2CP was measured as the amount of  $CO_2$  and  $HCO_3^-$  produced as pH value in serologic bottles remained as  $7.1 \pm 0.4$  during all the experimentation. The total  $CO_2$  plus  $HCO_3^-$  was

determined as the difference between  $HCO_3^-$  generated by the different tests conducted minus those amounts measured in the control cultures without an electron source. Respiratory behavior of the sludge was evaluated by consumption efficiencies ( $E$ , mg substrate consumed/mg substrate fed), yield products ( $Y$ , mg product/mg substrate consumed) and substrate specific consumption rates ( $q_s$ , mg of substrate consumed/mg VSS d). Substrate specific consumption rate was calculated using the equation  $qS = dS/dt \times 1/X$ , in which  $S$  is the substrate concentration (mg/L),  $t$  is time (d), and  $X$  is the biomass concentration in the culture (mg of VSS/L). The slope values obtained during the lineal phase consumption represent the  $qS$  values as reported by Elmen *et al.* (1997).

#### Analytical methods

Acetate concentration was measured by gas chromatography (HP model 5890, NJ USA) with a flame ionization detector (FID) and a capillary column (10 m and 0.53 mm internal diameter, Alltech AT 1000, Deerfield IL, USA). The temperatures of the column, detector and injector were 120, 150 and 130°C respectively. The carrier gas was  $N_2$  (4.5 ml/min). The concentration of 2CP and phenol was determined by HPLC (Waters 2996) using a C18 reverse-phase column ( $5\mu$ , 250 mm  $\times$  4.6 mm, phenomenex, Torrance, CA, USA) and a diode array detector at 280 nm. The mobile phase was acetonitrile/water (50/50 v/v) at a flow of 1.0 ml/min.  $CH_4$  and  $CO_2$  were quantified by gas chromatography (Varian model 3350, Walnut Creek, CA, USA) with a thermal conductivity detector and a stainless steel packed column (porapak Q on 80/100 mesh, 1.2 m and 1/8 in internal diameter). The temperatures of the column, detector and injector were 40, 100 and 100°C, respectively. The carrier gas was helium (18 ml/min). The organic and inorganic carbon was analyzed in a total organic carbon (TOC) analyzer (Shimadzu, TOC-5000A, Australia) as reported by Cuervo-López *et al.* (1999). Dissolved oxygen was measured with an oxymeter (Dissolved Oxygen Meter 9300 JENWAY). Total and volatile suspended solids (TSS, VSS) contents were determined at the end of each assay following standard methods (APHA 1998).

**Table 1** | Specific consumption rate, consumption efficiency and yield values of sludge with different previous contact time to 2CP. No external electron sources were added in these assays

	Contact time (d)		
	0	50	80
$Q_{2CP}^*$	$0.0014 \pm 0.0005$	$0.0022 \pm 0.0005$	$0.003 \pm 0.0005$
$E_{2CP}^\dagger$	$87.14 \pm 2.43$	$81.64 \pm 2.13$	$84.85 \pm 2.23$
$Y_{C-biogas/C-2CP}^\ddagger$	$0.84 \pm 0.10$	$0.70 \pm 0.12$	$0.88 \pm 0.08$
Lag phase (days)	$8 \pm 1$	$6 \pm 1$	$3 \pm 1$

\*Specific consumption rate (mg 2CP-C consumed/g SSV d).

†Efficiency (%).

‡Yield (formation of carbon biogas/carbon consumed of 2CP).

### Statistical analysis

Standard curves were drawn at least in triplicates for each analytical method. In all cases, the coefficient of variation for slope, coefficient of determination ( $R^2$ ) and intercept were less than 10%. In continuous culture, standard deviations were calculated from at least seven independent measurements obtained during the steady state (at least 10 HRT times were considered). Values obtained in batch assays represent mean values and the  $\pm$  range from two independent samples. In all cases, statistic analyses were conducted with the Number Cruncher Statistical System software (Hintze 2001).

## RESULTS AND DISCUSSION

### Continuous UASB reactor: methanogenic sludge source

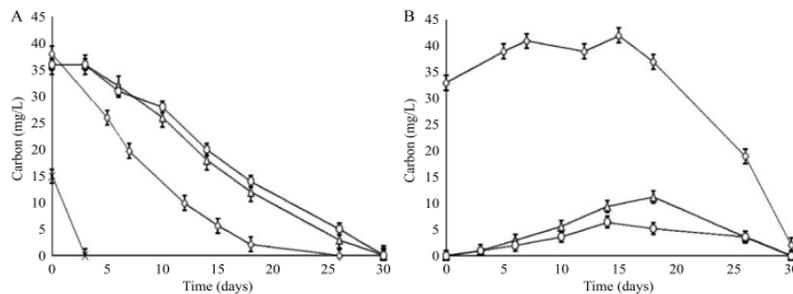
After eight weeks of UASB reactor operation acetate consumption efficiency ( $E_A$ ) was  $60 \pm 6\%$  and biogas

( $CO_2 + CH_4$ ) yield production ( $Y_{Biogas-C/Acetate-C}$ ) value was  $0.89 \pm 0.1$ . According to this value, the process had a dissimilative pattern mainly due to the C/N ratio used (38.6). Biogas production rate was  $121 \pm 8$  mg Biogas-C/L d. As the biogas production rate remained constant in the continuous reactor for about 3 months, it was presumed that the sludge was in methanogenic steady state. As a consequence the sludge acquired a higher physiological stability. This sludge was used as inoculum for batch assays.

### Batch cultures

#### Abiotic assays

Abiotic tests showed that loss of 2CP due to volatilization and adsorption on sludge was  $3.9\% \pm 0.3$  and  $5.1\% \pm 0.5$ , respectively. This quantity was used to correct the 2CP volatilization and adsorption in the rest of the assays Basu *et al.* (1996), reported similar values for 2CP adsorption on sludge.



**Figure 1** | A. 2CP consumption, with no acetate (○), with acetate (Δ) phenol (◊) as electron donor and acetate consumption (×). B. Phenol formation and consumption, with no acetate (○), with acetate (Δ), with phenol (◊).

**Kinetic assays**

*Previous contact to 2CP evaluation.* Results obtained with 28 mg of 2CP-C/L for each contact period to 2CP are shown in Table 1. No external electron sources were added in these assays. Irrespective of the previous contact of sludge to 2CP, no significant effect was observed on 2CP consumption efficiency ( $E_{2CP} = 84\%$ ) or biogas production yield ( $Y_{biogas-C/2CP-C} = 0.7 \pm 0.12$ ), when compared to the control assay using sludge without previous contact to the aromatic compound. Lower  $E_{2CP}$  values under methanogenic conditions have been reported with a lower 2CP concentration (14 mg 2CP-C/L) in spite of employing sludge with 70 days of previous contact to 2CP (Becker et al. 1999). Our results indicated that the lag phase was reduced by 62.5% when sludge with 80 days of previous contact was used when compared to the control without previous contact (Table 1). These results are in accordance with those reported by Fen-Xia Ye & Dong-Sheng Shen (2004), where using methanogenic sludge with 100 days exposition to monochlorophenols (MCP) resulted in a diminishing of 50% in the lag phase for 17 mg 2CP-C/L consumption. Nevertheless, it is important to remark that sucrose was added as an external electron donor, whereas, no external electron donor was included in the present work.

The 2CP specific consumption rate ( $q_{2CP}$ ) of the control was  $0.0014 \pm 0.0005$  mg C/g VSS d (Table 1), this value was significantly increased by 57 and 114% when sludge with previous contact of 50 and 80 days was respectively used ( $\alpha = 0.0022$ ). The  $q_{2CP}$  values obtained in this work were higher than those obtained by Basu et al. (1996), when using sludge with a higher previous contact time to 2CP (200 days) and enriched with 0.1% yeast extract (0.0019 mg C/g VSS d). Furthermore, no external source of electrons was added in our work. In all assays phenol was detected as an intermediary indicating that 2CP was consumed by the reductive dechlorination pathway (Basu et al. 1996; Becker et al. 1999).

**Electron donors**

These assays were conducted using sludge with 80 days of contact to 2CP. 2CP consumption profile in control assays (absence of electron donor) and in presence of acetate or

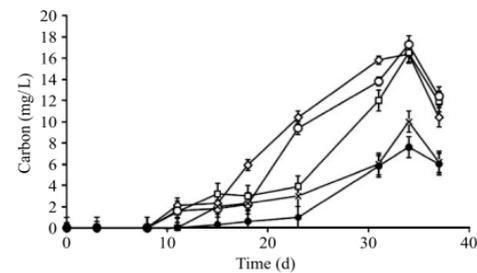
**Table 2** | Specific consumption rate, efficiency and yield values with acetate or phenol as electron donors

Treatment	$E_{2CP}$	$Y_{biogas-C/2CP-C}$	$q_{2CP}$
2CP Control <sup>§</sup>	$84.85 \pm 2.23$	$0.88 \pm 0.08$	$0.003 \pm 0.0005$
2CP + Acetate <sup>¶</sup>	$83.7 \pm 1.7$	$0.79 \pm 0.05$	$0.0028 \pm 0.0005$
2CP + Phenol <sup>  </sup>	$100 \pm 1.7$	$0.66 \pm 0.05$	$0.0044 \pm 0.0005$

<sup>§</sup>Without acetate.  
<sup>¶</sup>29.6 mg acetate/L.  
<sup>||</sup>With 41.3 mg phenol/L.

phenol are illustrated in Figure 1A. In all assays 2CP was consumed, transiently converted to phenol (Figure 1B) and finally converted to biogas (CO<sub>2</sub> and CH<sub>4</sub>) as has been previously reported during anaerobic digestion (Mikesell & Boyd 1985; Basu et al. 1996; Becker et al. 1999). Lag phase of 2 days in 2CP consumption in a control assay without external electron source addition is shown in Figure 1A. No significant variation in 2CP consumption profile was observed when acetate was included as an electron source (Figure 1A). Moreover, acetate consumption was independent of 2CP consumption indicating that this compound in stoichiometric ratio to 2CP was not used as an electron donor. In contrast no lag phase in 2CP consumption was observed when phenol was used as an electron donor (Figure 1A).

Consumption efficiency, yield product formation and specific consumption rate values for all the assays are presented in Table 2. In the assays where acetate was used as an electron donor, no significant variation in yield product, consumption efficiencies and specific rate values were observed when compared to the control assay without an external electron source. In contrast, when phenol was



**Figure 2** | Phenol production at four different oxygen concentrations without previous contact to 2CP. ◊ [phenol] without oxygen, ◻ [phenol] 0.5 mgO<sub>2</sub>/L, ○ [phenol] 1 mgO<sub>2</sub>/L, × [phenol] 1.5 mgO<sub>2</sub>/L, ● [phenol] 2 mgO<sub>2</sub>/L.

**Table 3** | Specific consumption rate, efficiency and yield values obtained at different oxygen concentrations when using sludge without exposure to 2CP and oxygen and with 80 days of previous contact time to 2CP and oxygen

Without previous contact					
Oxygen mg/L	0	0.5	1	1.5	2
$q_{2CP}^{**}$	0.0015 ± 0.0003	0.0012 ± 0.0005	0.0013 ± 0.0005	0.0015 ± 0.0003	0.0014 ± 0.0004
$E_{2CP}^{††}$	100 ± 2.3	92.1 ± 3.2	95.2 ± 3.1	95.4 ± 2.4	88.1 ± 3.1
$Y_{CH_4-C/2CP-C}^{‡‡}$	0.7 ± 0.11	0.6 ± 0.09	0.4 ± 0.13	0.4 ± 0.08	0.3 ± 0.09
With 80 days of previous contact					
Oxygen mg/L	0	0.5	1	1.5	2
$q_{2CP}^{**}$	0.0029 ± 0.0003	0.0028 ± 0.0005	0.003 ± 0.0003	0.0026 ± 0.0004	0.0027 ± 0.0003
$E_{2CP}^{††}$	81.8 ± 3.6	75.2 ± 6.4	77.9 ± 3.7	78.9 ± 3.6	80.7 ± 2.4
$Y_{CH_4-C/2CP-C}^{‡‡}$	0.8 ± 0.09	0.6 ± 0.1	0.4 ± 0.13	0.3 ± 0.15	0.3 ± 0.12

\*\*  $q_{2CP}$  (mg C consumed/g SSV d).

†† E, Efficiency (%).

‡‡ Yield (formation of carbon methane/C consumed of 2CP).

used a significant increase in 2CP specific consumption rate value (from 0.003 to  $0.0044 \pm 0.0005$  mg C/g VSS d) was obtained ( $\alpha = 0.0041$ ). This increase could be mainly attributed to the presence of phenol rather than a previous contact sludge effect. These results indicate that phenol in stoichiometric ratio to 2CP could be used as an electron donor in order to enhance the 2CP specific consumption rate.

### Oxygen addition effect

It has been reported that small amounts of oxygen increased the consumption rate (Kato et al. 1997) and the consumption efficiency (Macarie & Guiot 1996; Tartakovsky et al. 1998; Gardin et al. 2001) of recalcitrant compounds. Therefore, some assays were conducted in order to evaluate whether the presence of small amounts of oxygen would enhance the 2CP consumption under methanogenic conditions. Oxygen addition was evaluated using both, sludge without exposure to oxygen and 2CP and sludge with 80 days of previous contact to oxygen and 2CP. The results obtained when using sludge with no exposure to oxygen and 2CP indicated that similarly to the anaerobic assays, regardless of oxygen concentration a lag phase in 2CP consumption between 8 to 10 days was present (Figure. 2). It can be observed that the 2CP consumption pattern was very similar among all the assays irrespective of the initial oxygen concentration when compared to the control assay without oxygen. A slight effect of oxygen

on  $E_{2CP}$  values was obtained as  $E_{2CP}$  ranged from 85 to 95% whereas no effect was observed on specific consumption rates as these values remained without significant variation (Table 3).  $CO_2$  and methane were determined as final products of 2CP mineralization. Nevertheless, according to methane yield values ( $Y_{CH_4-C/2CP-C}$ ) included in Table 3, methane production decreased as oxygen concentration was higher accounting for a diminishing of 50% in  $Y_{CH_4-C/2CP-C}$  at 2 mg  $O_2/L$  while the yield of carbon dioxide ( $Y_{CO_2-C/2CP-C}$ ) increased when compared to the methanogenic control without oxygen. Garibay et al. (2005) reported that the consumption efficiency of two UASB reactors under partially aerated methanogenic conditions added with 2 and 15 vvd (air volume/reactor volume day) treating 2,4,6 trichlorophenol (TCP) and phenol, remained close to 100%. Nevertheless, a reduction of 82.7% in methanogenic activity was also observed. However, Durán et al. (2008), when treating polymeric resins in UASB reactors added with 1 mg  $O_2/L$  observed an increase in the specific consumption rate of the polymeric resin concomitant with a reduction in methane production.

**Table 4** | Phenol formation at four different oxygen concentrations

mg $O_2/L$	% Phenol
0.5	93.4 ± 3.2
1	77.7 ± 4.6
1.5	50.3 ± 4.9
2	42.1 ± 3.8

**Table 5** | Mass balance in presence of different oxygen concentrations

Treatment [O <sub>2</sub> ]	Initial (mg C/L)	Final mg C/L	Phenol	Gas Production	Undetermined carbon	Total
	2CP	2CP				
0	28.9 ± 2.9	0	10.4 ± 1.3	16.0 ± 1.8	2.4 ± 0.8	26.4 ± 2.1
0.5	31.0 ± 1.9	2.4 ± 2.1	12.5 ± 1.5	12.7 ± 2.3	3.3 ± 1.2	27.7 ± 0.7
1	31.5 ± 2.5	1.4 ± 1.6	9.4 ± 1.3	16.3 ± 1.2	4.1 ± 1.0	27.3 ± 1.1
1.5	32.0 ± 2.2	4.6 ± 1.8	6.7 ± 1.9	15.7 ± 1.8	4.8 ± 1.2	27.2 ± 1.7
2	30.3 ± 1.8	3.6 ± 2.2	5.6 ± 1.5	13.0 ± 1.8	8.0 ± 1.3	22.3 ± 1.5

In the present work, phenol production was also detected in all assays as an intermediary during the reductive dechlorination reaction; however, phenol concentration was diminished as the initial oxygen concentration increased (Figure 2). In fact, a reduction of 42% in phenol production was measured when 2 mg O<sub>2</sub>/L was assessed (Table 4) suggesting the simultaneous aerobic and anaerobic respiration of 2CP. It is known that aerobic respiration results in intermediaries other than phenol such as chlorocatechols (Farrell & Bridge 1999). In fact, a mass balance in terms of carbon (Table 5) indicated the presence of 2CP, phenol, CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub> and an undeterminable fraction of carbon.

The amount of this undeterminable carbon increased concomitantly when the oxygen concentration added was higher accounting for 10 to 26% of total carbon at 0.5 and 2 mg O<sub>2</sub>/L, respectively. This carbon fraction might correspond to chlorocatecholes formation by the aerobic pathway. All these results indicated that under methanogenic conditions, the use of different oxygen concentrations and sludge with no exposure to 2CP promoted the aerobic respiration and did not enhance the anaerobic 2CP consumption pattern, particularly, the 2CP specific consumption rate. The effect of using sludge with 80 days of previous contact to 2CP and oxygen at different initial oxygen concentrations (0.5–2 mg O<sub>2</sub>/L) was also evaluated. In all cases, the lag phase for 2CP consumption was reduced 38% when compared to the assays where sludge without previous contact to 2CP was used. Likewise, the 2CP consumption period was diminished 11%. Consumption efficiency, yield product formation and specific consumption rate values are presented in Table 3. No significant effect of oxygen addition was observed on 2CP consumption efficiency values ( $E_{2CP} = 80 \pm 3.1\%$ ). Likewise, 2CP specific

consumption rate values remained without significant change irrespective of the oxygen concentration evaluated. In contrast, 2CP specific consumption rate increased 73% when compared to assays where sludge with no exposure to 2CP and oxygen was used. It is interesting to note that this  $q_{2CP}$  values are similar to those obtained under anaerobic conditions when sludge with 80 days of previous contact to 2CP was used (Table 2). Therefore, the decrease in lag phase, 2CP consumption time and increase in  $q_{2CP}$  values obtained might be due to the sludge exposure to 2CP rather than oxygen addition. Finally, in a similar way with assays using sludge without previous contact to oxygen and the aromatic compound, a significant difference in methane and phenol production yield values was obtained as oxygen concentration was increased ( $\alpha = 0.015$ ). In fact, these values decreased whereas oxygen concentration added was higher suggesting that the different oxygen concentrations evaluated promoted the aerobic respiration.

## CONCLUSIONS

The use of sludge with a previous contact (80 days) to 2CP resulted in a lag phase reduction of 57% with a concomitant increment of 114% in  $q_{2CP}$ . These results were obtained without the addition of an external electron donor. The use of phenol as an electron donor in stoichiometric ratio to 2CP resulted in significant increases in  $q_{2CP}$  values (46%), whereas no effect on  $q_{2CP}$  values was observed when acetate was the electron donor. The addition of different initial oxygen concentrations under methanogenic conditions did not enhance the  $q_{2CP}$  values. Nevertheless, the use of sludge previously exposed (80 days) to both 2CP and O<sub>2</sub> resulted in an increase of 73% in  $q_{2CP}$ . Thus, the increase in  $q_{2CP}$  values obtained might be due to the sludge exposure to 2CP rather

than oxygen addition. Therefore, the use of sludge with previous contact to 2CP results in it being a key parameter for enhancing 2CP specific consumption rate.

### ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the project SEP-CONACYT CB-2005-C01-49748-Z.

### REFERENCES

- APHA 1998 *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, 20th edition, Washington DC, USA.
- Basu, S. K., Oleszkiewicz, J. A. & Sparling, R. 1996 Dehalogenation of 2-Chlorophenol in anaerobic batch cultures. *Water Res.* **30**, 315–322.
- Becker, G. J., Sthal, D. A. & Rittmann, B. E. 1999 Reductive dehalogenation and conversion of 2-Chlorophenol to 5-Chlorobenzoate in a methanogenic sediment community: implication for predicting the environmental fate of chlorinated pollutants. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 5169–5172.
- Bhatt, P. M., Kumar, S., Mudliar, S. & Chakrabarti, T. 2007 Biodegradation of chlorinated compounds - a review. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* **35**, 165–198.
- Buitrón, G., González, A. & López-Marín, L. M. 1998 Biodegradation of phenolic compounds by an acclimated activated sludge and isolated bacteria. *Water Sci. Technol.* **37**(4), 371–378.
- Cuervo-López, F., Martínez, F., Gutiérrez-Rojas, M., Loyola, R. A. & Gómez, J. 1999 Effect of nitrogen loading rate and carbon source on denitrification sludge settleability in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. *Water Sci. Technol.* **40**(8), 123–130.
- Durán, U., Monroy, O., Gómez, J. & Ramírez, F. 2008 Biological wastewater treatment for removal polymeric resins in UASB reactor: influence of oxygen. *Water Sci. Technol.* **57**, 1047–1052.
- Elmen, J., Pan, W., Leung, S. Y., Magyarosy, A. & Keasling, J. D. 1997 Kinetics of toluene degradation by a nitrate-reducing bacterium isolated from a groundwater aquifer. *Biotechnol. Bioeng.* **55**, 82–90.
- [EPA] Environmental Protection Agency. Available from: [www.epa.gov/safewater/mcl.html](http://www.epa.gov/safewater/mcl.html). (Accessed in June 2009).
- Farrell, A. & Bridge, Q. 1999 Degradation of mono-chlorophenols by mixed microbial community via a meta-cleavage pathway. *Biodegradation* **10**, 353–362.
- Gardin, H., Lebeault, J. M. & Pauss, A. 2001 Degradation of 2,4,6-trichlorophenol (2,4,6-TCP) by co-immobilization of anaerobic and aerobic microbial communities in an upflow reactor under air-limited conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56**, 524–530.
- Garibay, O. C., Rios, L. E., Garcia, M. J. & Poggi, V. H. M. 2005 2,4,6-trichlorophenol and phenol removal in methanogenic and partially-aerated methanogenic conditions in a fluidized bed bioreactor. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **80**, 1180–1187.
- Hintze, J. 2001 *Number Cruncher Statistical System (NCSS)*. NCSS, Kaysville, UT.
- Kato, M., Field, J. A. & Lettinga, G. 1997 Anaerobe tolerance to oxygen and the potentials of anaerobic and aerobic cocultures for wastewater treatment. *Braz. J. Chem. Eng.* **14**, 1–14.
- Macarie, H. & Guiot, S. 1996 Pentachlorophenol degradation using a simultaneous anaerobic-aerobic process: a new technology for wastewater treatment. *Frontiers of Biotechnology and Bioengineering*, ed. E. Galindo, Mexican Soc. Biotechnol., Bioeng-SMBB, México DF, México, pp. 317–324.
- Mars, A. E., Kasberg, T., Kaschabek, S. R., Van Agteren, M. H., Janssen, D. B. & Reineke, W. 1997 Microbial degradation of chloroaromatics: use of the meta-cleavage pathway for mineralization of chlorobenzene. *J. Bacteriol.* **179**, 4530–4537.
- Majumber, S. M. & Gupta, S. K. 2007 Removal of chlorophenols in sequential anaerobic-aerobic reactors. *Bioresour. Technol.* **98**, 118–129.
- Manimekalai, R. & Swaminathan, T. 2000 Removal of hazardous compounds by lignine peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Bioprocess Eng.* **22**, 29–33.
- Mikesell, M. D. & Boyd, S. A. 1985 Reductive dechlorination of the pesticides 2,4-D, 2,4,5-T and Pentachlorophenol in Anaerobic Sludges. *J. Environ. Qual.* **14**, 337–340.
- Monsalvo, V. M., Mohedano, A. F., Casas, J. A. & Rodriguez, J. J. 2009 Cometabolic biodegradation of 4-chlorophenol by sequencing batch reactors at different temperatures. *Bioresour. Technol.* **100**(20), 4572–4578.
- Nalbur, B. E. & Alkan, U. 2007 The inhibitory effects of 2CP and 2,4-DCP containing effluents on sequencing batch reactors. *Int. Biodeterior. Biodegradation* **60**, 178–188.
- Parker, W. J., Farquhar, G. F. & Hall, E. R. 1993 Removal of chlorophenolics and toxicity during high-rate anaerobic treatment of segregated kraft mill bleach plant effluents. *Environ. Sci. Technol.* **27**, 1783–1789.
- Sahinkaya, E. & Dilek, F. B. 2006 Effect of biogenic substrate concentration on the performance of sequencing batch reactor treating 4-CP and 2,4-DCP mixtures. *J. Hazard. Mater.* **4**, 258–264.
- Tartakovsky, B., Miguez, C. B., Petti, L., Bourque, D., Groleau, D. & Guiot, S. R. 1998 Tetrachloroethylene dechlorination using a consortium of coimmobilized methanogenic and methanotrophic bacteria. *Enzyme Microbiol. Technol.* **22**, 255–260.
- Ye, F.-X. & Shen, D.-S. 2004 Acclimation of anaerobic sludge degrading chlorophenols and the biodegradation kinetics during acclimation period. *Chemosphere* **54**, 1573–1580.

## 5. BIODEGRADACIÓN DEL 2-CLOROFENOL (2CP) EN UN REACTOR ANAEROBIO DE LOTE SECUENCIADO (ASBR)

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos de la biodegradación del 2-clorofenol (2CP) en reactores anaerobios de lote secuenciado (ASBR). La información de este capítulo se envió para su publicación y se encuentra aceptado por la revista **Water Science & Technology**.

Beristain-Montiel L., Gómez-Hernández J., Monroy-Hermosillo O., Cuervo-López F., Ramírez-Vives F. (2011). **Biodegradation of 2-Chlorophenol (2CP) in an anaerobic sequencing batch reactor (ASBR)**. Water Sci. Technol. (in press).

En el presente trabajo se estudió la degradación del 2-Clorofenol (2CP) en dos reactores anaerobios de lote secuenciado (ASBR). El reactor ASBR<sub>A</sub> fue operado con 2CP como única fuente de carbono y energía, mientras que el reactor ASBR<sub>B</sub> fue alimentado con una mezcla de 2CP y fenol como donador de electrones. Fueron evaluadas las siguientes concentraciones de 2CP (mg C/L): 28, 42, 56, 84, 112, 140 y 196 en ambos reactores. En el reactor ASBR<sub>B</sub> se evaluaron las siguientes concentraciones de fenol (mg C/L): 28, 42, 56, 84, 112, 140 y 196. Los ciclos de operación de los reactores fueron definidos como sigue: llenado, 15 min; reacción: variable (tiempo para obtener una  $E_{2CP} \geq 90\%$ ); sedimentación del lodo, 2 horas y drenado 15 min. El proceso respiratorio fue evaluado mediante tres variables de respuesta, i) eficiencia de consumo de sustrato ( $E_{2CP}$ ), ii) rendimiento de producción de biogás ( $Y_{biogas-C/2CP-C}$ ) y iii) velocidad específica de consumo de sustrato ( $q_{2CP}$ ). La sedimentabilidad del lodo fue evaluada a través del índice volumétrico del lodo (IVL) y concentración de sustancias exopoliméricas (SEP).

La eficiencia de consumo permaneció constante ( $90 \pm 0.4\%$ ) durante la operación de ambos reactores a todas las concentraciones evaluadas. Los rendimientos de producción de biogás oscilaron entre  $0.80 \pm 0.06$  en ambos reactores de 28 a 140 mg C-2CP/L, sin embargo a 196 mg C-2CP/L se observó un decremento del  $78 \pm 3\%$  en los  $Y_{biogas-C/2CP-C}$  en el reactor ASBR<sub>A</sub> y ASBR<sub>B</sub>. La disminución en

los rendimientos puede estar asociada a la acumulación de ácidos grasos volátiles (AGV) la cual únicamente se presentó a 196 mg C-2CP/L. La composición de los AGV consistió en su mayoría de valerato y propionato. La velocidad específica de consumo de 2CP incrementó su valor cinco veces ( $0.6 \pm 0.08$  a  $3.5 \pm 0.2$  mg C-2CP/g SSV·d) al aumentar la concentración de 28 a 112 mg C-2CP/L en ambos reactores. Sin embargo, se observó un decremento del 37% y 72% en la velocidad específica de consumo a 140 y 196 mg C-2CP/L, respectivamente. El lodo presentó buenas características de sedimentación en todas las concentraciones en el reactor ASBR<sub>A</sub>, presentando valores de IVL y proteína exopolimérica (PE) de  $100 \pm 5$  mL/g y 60 mg PE/L respectivamente. Sin embargo, en el reactor ASBR<sub>B</sub> a 140 y 196 mg C-2CP/L los valores del IVL y proteína exopolimérica incrementaron significativamente, provocando problemas en la sedimentabilidad del lodo.

## Biodegradation of 2-chlorophenol (2CP) in an anaerobic sequencing batch reactor (ASBR)

Lizeth Beristain-Montiel, Jorge Gómez, Oscar Monroy,  
Flor de María Cuervo-López and Florina Ramírez-Vives

### ABSTRACT

The aim of this study is to contribute to the knowledge about anaerobic digestion of 2-chlorophenol (2CP) in an anaerobic sequencing batch reactor (ASBR). Two reactors were set up (ASBR<sub>A</sub> and ASBR<sub>B</sub>). The ASBR<sub>A</sub> was fed with 2-chlorophenol (28–196 mg 2CP-C/L) and no other exogenous electron donor. The ASBR<sub>B</sub> was fed with a mixture of 2CP (28–196 mg 2CP-C/L) and phenol (28–196 mg phenol-C/L) as an electron donor. The process evaluation was conducted by three means: first by substrate consumption efficiency ( $E_{2CP}$ ). Second, by biogas yield ( $Y_{\text{biogas-C/2CP-C}}$ ) and third, by the specific consumption rates ( $q_{2CP}$ ) as response variables. The 2CP consumption efficiency ( $90 \pm 0.4\%$ ) was not influenced by the increase in the concentrations tested. In both reactors ASBR<sub>A</sub> and ASBR<sub>B</sub>, both concentration as well as speed increased. Concentration increased from 28 to 114 mg 2CP-C/L. The specific consumption rates values ( $q_{2CP}$ ) values were fivefold higher. However, a decrease of 37% was observed at 140 mg 2CP-C/L and one of 72% at 196 mg 2CP-C/L. The biogas yields ( $0.80 \pm 0.06$ ) remained stable in both reactors. In both reactors the biogas yield decreased to  $78 \pm 3\%$  at 196 mg 2CP-C/L. We might assume this decrease was due to the accumulation of VFA. Finally, poor sludge settleability was determined only in the SBR<sub>B</sub> reactor at 140 and 196 mg 2CP-C/L. An increase was observed in both  $SVI \leq 140 \pm 5$  mL/g and over exopolimeric protein  $\leq 120$  mg EP/L.

**Key words** | anaerobic digestion, anaerobic sequencing batch reactor (ASBR), 2-chlorophenol (2-CP)

Lizeth Beristain-Montiel  
Jorge Gómez  
Oscar Monroy  
Flor de María Cuervo-López  
Florina Ramírez-Vives (corresponding author)  
Department of Biotechnology,  
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa,  
Av San Rafael Atlixco 186,  
Vicentina,  
CP 09340 Mexico City,  
Mexico  
E-mail: frav@xanum.uam.mx

### INTRODUCTION

Chlorophenols are naturally found in the environment as lignin derivatives, tannins and some phenolic amino acids (Sierra & Lettinga 1990). However, some human activities such as waste incineration, water chlorination, uncontrolled use of wood preservatives, pesticides, fungicides and herbicides, have contaminated sources containing chlorophenols. We are particularly focusing our attention on 2-chlorophenol (2CP), a water-soluble compound which can easily migrate and contaminate aqueous media. It can be formed as a result of polychlorated compounds (Sahinkaya & Dilek 2006). Due to its high toxicity and persistence in the environment, chlorophenols and 2CP might become carcinogenic and mutagenic provoking serious health problems (Armenante *et al.* 1999).

The biological removal of 2CP in anaerobic environments often begins with its reductive dechlorination to

phenol, followed by benzoate formation due to phenol carboxylation and dehydroxylation (Basu *et al.* 1996), with its final conversion into biogas (Häggbloom *et al.* 1995). Nevertheless, in most cases this process requires 70–210 days (Häggbloom *et al.* 1993; Basu *et al.* 1996; Sahinkaya & Dilek 2006). It has been reported that under anaerobic conditions of the aromatic compounds, the deshalogenation in the harder step (Häggbloom & Bossert 2003). Some authors have suggested that the addition of an electron donor or sludge acclimation (Bhatt *et al.* 2007) may enhance the consumption of chlorinated aromatic compounds. Readily degradable organic compounds or an intermediate of the dechlorination pathway (Bhatt *et al.* 2007), have been used as the electron donors.

Moreno & Buitrón (2004), suggest that the conditions and time in which acclimation take place are important

to the system performance. It has been shown that sequencing batch reactors (SBR) may favor the acclimation during their cycles of operation causing some advantages for the treatment of toxic compounds, like the removing a long stage of acclimation (Monsalvo *et al.* 2009). This is a great advantage because it has been reported that continuous systems requires long acclimation periods. In this regard, Chang *et al.* (2003) used a SMBR (Silicone membrane bioreactor) with a sludge acclimated by 110 days to eliminate 14 mg 2CP-C/L. Majumder & Gupta (2007) used a UASB (Upflow anaerobic sludge blanked) and RBC (Rotating Biological Contactors) in series for the removal of 18.6 mg 2CP-C/L with sludge acclimated by 190 days. Furthermore, the fact is that acclimation is favored during SBR operation. It has also been suggested the use of these reactors as a viable treatment option because they can support fluctuations in the flow of wastewater (Monsalvo *et al.* 2009). Additionally, SBR has a high operational flexibility which makes it capable of imitating continuous flow systems obtaining similar or higher yields

Q1 (Tomei *et al.* 2003).

SBR and Anaerobic Sequencing Batch Reactor (ASBR) systems are similar procedures in treating pollutants. However there is a difference between them: whereas ASBR works under anaerobic conditions, SBR does not. ASBR has been widely studied for wastewater treatment because of the following advantages: good solids retention, sedimentation elimination as a secondary step, efficient operating control, high efficiency organic matter removal, biogas production and simple operation (Zaiat *et al.* 2001). ASBR technology has been successfully applied in laboratories and pilot scales for high strength wastewaters treatment, such as landfill leachate and slaughterhouse wastewater, municipal sludge and dairy wastewater (Xiangwen *et al.* 2008). However, studies about 2CP biodegradation using ASBR reactor are scarce. Thus, this work is focused on assessing in two ASB reactors (i) the kinetic performance of the methanogenic process at different concentrations of 2-chlorophenol (2CP-C mg/L: 28, 42, 56, 84, 112, 140 and 196) and a mixture of 2CP (mg 2CP-C/L: 28, 42, 56, 84, 112, 140 and 196) and phenol (Phenol-C mg/L: 28, 42, 56, 84, 112, 140 and 196) as the electron donor, and (ii) the settling properties of sludge. Methanogenic process performance was evaluated by means of substrate consumption efficiencies ( $E_{2CP}$ ), yield product ( $Y_{biogas-C/2CP-C}$ ) and 2CP specific consumption rates ( $q_{2CP}$ ), whereas sludge settleability was evaluated by means of sludge volume index (SVI) and exopolimeric substances (ES).

## MATERIALS AND METHODS

### Continuous reactor and inoculum source

An Upflow Anaerobic Sludge Blanket (UASB) reactor inoculated with 0.42 L of anaerobic sludge (17.6 g VSS/L) obtained from a wastewater treatment plant (Central malt, Puebla, México) was set up. Influent composition was as follows (g/L):  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (0.703),  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (0.028),  $\text{MgSO}_4$  (0.111),  $\text{CaCl}_2$  (0.1),  $\text{NaCl}$  (0.297),  $\text{KCl}$  (0.5) and 1 mL/L of the following trace compounds solution (mg/L) was also added:  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (2),  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (0.786),  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  (0.1),  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (0.05),  $\text{ZnCl}_2$  (0.05),  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$  (0.05),  $\text{AlCl}_3$  (0.05),  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (0.05),  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (0.07),  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0.05) and 0.05 mL/L of concentrated HCl was added. This mineral medium was also used for SBR assays. The UASB reactor was operated with an hydraulic retention time (HRT) of 2 days at  $32 \pm 0.5$  °C and fed with 146 mg acetate-C/L-d during 3 months. Under these experimental conditions, loading and unloading carbon rates as well as biogas production rates were determined. Methanogenic steady state was considered when variations in these data were lower than 10%. When steady state was achieved, 400 mL (8 g VSS/L) of methanogenic sludge was withdrawn from the reactor. They were washed three times with saline solution (NaCl 0.9%) and placed in a flask within a mineral medium in presence of 28 mg 2CP-C/L at  $32 \pm 2$  °C and with no agitation. After 50 days when 2CP consumption efficiency was 95%, the sludge was washed again and used for inoculating the two SBR reactors.

### Kinetic assays with 2CP and phenol

Two ASBR reactors (ASBR<sub>A</sub> and ASBR<sub>B</sub>) with an operation volume of 1.3 L, inoculated with  $3.5 \pm 0.21$  g VSS/L of methanogenic sludge were set up. The reactors were incubated at  $32 \pm 2$  °C, pH 7 (initial value), nitrogen atmosphere and stirred at 100 rpm. Peristaltic pumps were used for feeding, effluent discharging and reactor sampling. Time cycles was defined as follows: filling = 15 min; reaction time = variable (time required achieving  $E_{2CP} \geq 90\%$ ); sludge settlement = 2 h and drawing = 15 min. ASBR<sub>A</sub> was fed with different concentrations of 2CP (2CP-C mg/L: 28, 42, 56, 84, 112, 140 and 196) and ASBR<sub>B</sub> with a mixture of 2CP (mg 2CP-C/L: 28, 42, 56, 84, 112, 140 and 196) and phenol (mg Phenol-C/L: 28, 42, 56, 84, 112, 140 and 196) as the electron donor. Concentrations were increased,

according to the steady specific consumption rate, every 3 to 5 cycles. The samples were withdrawn along operational cycles. In order to evaluate the kinetic performance of methanogenic respiratory process the concentrations of 2CP, phenol, volatile fatty acid (VFA) and biogas were measured. The sludge settleability was evaluated through SVI and exopolymeric substance concentrations.

### Abiotic assays

In order to verify possible losses of 2CP by volatilization or adsorption in the sludge, abiotic assays were taken from ASBR reactors supplemented with 84 mg 2CP-C/L during a period of 20 days at the conditions described above for kinetic assays. Volatilization evaluation was carried out through the addition of 2CP and mineral medium without sludge. On the other hand 2CP absorption was assessed through mineral medium and sterilized sludge. Both volatilization and adsorption were calculated as the difference between the initial and the final 2CP concentration measured in the liquid phase.

### Evaluation of respiratory behavior and sludge settleability

The respiratory behavior of sludge was evaluated from the data obtained in the kinetic assays by means of consumption efficiencies ( $E$ , mg substrate consumed/mg substrate fed), yield products ( $Y$ , mg product/mg substrate consumed) and substrate specific consumption rates ( $q_s$ , mg of substrate consumed/mg VSS d). The substrate specific consumption rate was calculated using the equation  $q_s = (dS/dt) \times (1/X)$ , in which  $S$  is the substrate concentration (mg/L),  $t$  is time (d), and  $X$  is the biomass concentration in the culture (mg of VSS/L). The slope values obtained during the lineal phase consumption represent the  $q_s$  values as reported by Elmen *et al.* (1997).

The sludge settleability was determined from the samples of kinetics assays through the sludge volume index (SVI<sub>0.1</sub>), according to the volume occupied by 1 g of sludge after 30 min as reported by Martínez *et al.* (2004).

### Analytical methods

The VFA concentration was measured by gas chromatography (HP model 5890, NJ, USA) with a flame ionization detector (FID) and a capillary column (10 m and 0.53 mm internal diameter, Alltech AT 1000, Deerfield IL, USA). The temperatures of the column, detector and injector were 120,

150 and 130 °C respectively. The carrier gas was N<sub>2</sub> (4.5 mL/min). The concentration of 2CP and phenol was determined by HPLC as reported by Beristain *et al.* (2010). The organic and inorganic carbon was analyzed in a total organic carbon (TOC) analyzer (Shimadzu, TOC-5000A, Australia) as reported by Cuervo-López *et al.* (1999). Total and volatile suspended solids (TSS, VSS) contents were determined at the end of each assay following standard methods (APHA 1998). The SVI<sub>0.1</sub>, and extraction of exopolymeric substance was determined as reported by Martínez *et al.* (2004). Exopolymeric carbohydrates and proteins were quantified by the methods to Dubois *et al.* (1956) and Lowry *et al.* (1951).

For each analytical method, standard curves were performed by triplicate. In all cases, the variation coefficient was less than 10%.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Kinetic assays in presence of 2CP and phenol

The 2CP losses by volatilization and adsorption determined in the SBR reactors were 3.1% ± 0.5 and 4.5% ± 0.3, respectively. These values were used for correcting biotic assays.

No matter 2CP and phenol concentration as well as number of cycle operation (Table 1) high 2CP consumption efficiencies ( $E_{2CP}$ ) were obtained in both ASBR<sub>A</sub> and ASBR<sub>B</sub> reactors. The 2CP consumption was observed in ASBR<sub>A</sub> in spite of the fact that no external electron donor was added. Some authors have suggested that a selection of specialized organisms are able to consume chlorophenols as sole carbon and energy sources could be obtained in microbial consortia after an acclimation period (Moreno & Buitrón 2004). It has also been reported that some proteins are often used as carbon sources during the biotransformation of chlorophenols (Sahinkaya & Dilek 2006). In fact, it is noteworthy that soluble proteins (100–200 mg protein/L) were determined in both reactor effluents. These compounds could partially be used for supporting 2CP consumption.

No significant differences in production yields of biogas (0.8 ± 0.4) were observed at 2CP concentrations ranging from 28 to 140 mg 2CP-C/L in both reactors (Table 1). However, at 196 mg 2CP-C/L a significant decrease of 78 ± 3% in biogas production yields was obtained in both reactors. These results could be attributed to the higher 2CP concentration assayed. In this sense, Sierra & Lettinga (1990) registered in batch methanogenic cultures inhibition of

**Table 1** | Consumption efficiencies and methane production yields at different concentrations of 2CP in both ASBR<sub>A</sub> and ASBR<sub>B</sub>

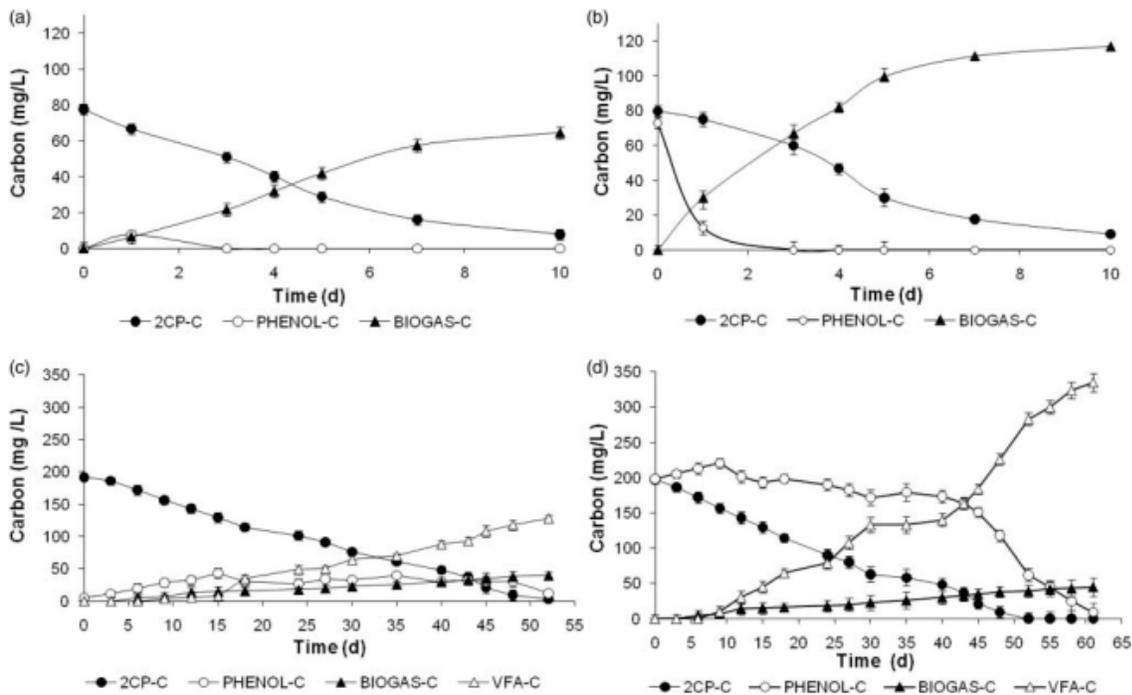
Treatment	Efficiencies (%)		Yield ( $Y_{\text{biogas-C/2CP-C}}$ )	
	ASBR <sub>A</sub>	ASBR <sub>B</sub>	ASBR <sub>A</sub>	ASBR <sub>B</sub>
28 mg 2CP-C/L (cycle 4)	90.6 ± 0.5	91.4 ± 0.7	0.81 ± 0.06	0.85 ± 0.09
42 mg 2CP-C/L (cycle 9)	92.8 ± 0.6	92 ± 0.6	0.83 ± 0.08	0.84 ± 0.07
56 mg 2CP-C/L (cycle 12)	91.6 ± 0.4	90.8 ± 0.4	0.83 ± 0.07	0.84 ± 0.08
84 mg 2CP-C/L (cycle 15)	91.3 ± 0.6	92.3 ± 0.5	0.84 ± 0.05	0.82 ± 0.05
112 mg 2CP-C/L (cycle 20)	90.4 ± 1.3	92.5 ± 0.6	0.83 ± 0.02	0.87 ± 0.08
140 mg 2CP-C/L (cycle 25)	92.3 ± 2.6	93 ± 1.9	0.80 ± 0.04	0.80 ± 0.05
196 mg 2CP-C/L (cycle 28)	89.2 ± 2.3	93.5 ± 3.0	0.18 ± 0.05	0.22 ± 0.08

acetoclastic methanogenesis at 2CP concentrations higher than 210 mg 2CP-C/L.

Figure 1(a) and (b) shows the kinetic performance of 2CP consumption and biogas production obtained in cycle 16 (84 mg 2CP-C/L). Concentrations from 28 to 140 mg 2CP-C/L resulted in similar consumption profiles behavior in both reactors, even when the phenol was added as the electron source in ASBR<sub>B</sub>. Under anaerobic conditions,

the reductive dehalogenation was the predominant process (Hägglom *et al.* 1993). Moreover, biogas production was measured as evidence of methanogenesis.

The ASBR<sub>B</sub> 2CP consumption took place independently from the phenol consumption which occurred in the early days (Figure 1(b)). This result suggests that at the experimental conditions established in our work, phenol was not used as the electron donor for the 2CP consumption. Some



**Figure 1** | Profile of 2CP consumption, phenol, and biogas production (a) with 84 ± 5 mg 2CP-C/L as sole carbon and energy source (cycle 16), (b) with 84 ± 5 mg 2CP-C/L and 84 ± 4 mg C-phenol/L as the electron donor (cycle 16), (c) with 196 ± 5 mg 2CP-C/L as the sole source of carbon and energy (cycle 28), (d) with 196 ± 9 mg 2CP-C/L and 196 ± 8 mg C-phenol/L as the electron donor (cycle 28).

studies suggest that the addition of an electron donor may favor the consumption of chlorophenols in batch or continuous systems (Hägglom *et al.* 1993; Basu *et al.* 1996; Sahinkaya & Dilek 2006; Beristain *et al.* 2010). Our research provides evidence that the use of an SBR could replace the addition of an electron donor. This could be observed because of a successful acclimation during the reactor operation, according to Monsalvo *et al.* (2009). They reported that no significant differences were observed in 4CP consumption when phenol was used as an electron donor. The authors suggest that this behavior was the result of the capacity of sludge to use 4CP as sole carbon and energy source, caused by the good sludge acclimation achieved during the operation of SBR.

The profiles of 2CP specific consumption rate obtained along the cycles in both reactors are shown in Figure 2(a)  $q_{2CP}$  was determined every 3 to 5 cycles of operation at each concentration assayed, considering that  $q_{2CP}$

stabilization was achieved within this period. A similar profile was observed in both reactors ASBR<sub>A</sub> and ASBR<sub>B</sub>. Thus, the presence of phenol as the electron donor has no effect on  $q_{2CP}$ .

In both cases,  $q_{2CP}$  increased as substrate concentration (up to 112 mg 2CP-C/l) and the operational cycles occurred. In fact,  $q_{2CP}$  value increased from  $0.73 \pm 0.15$  to  $3.81 \pm 0.32$  2CP-C/gSSV mg at 28 mg 2CP-C/L and 112 mg 2CP-C/L. These results could be mainly attributed to three facts: (i) the induction of enzyme systems associated with consumption of 2CP (Tomei *et al.* 2003); (ii) the selection of microorganisms capable of consuming this toxic compound through the operational cycles (Hu *et al.* 2005) and (iii) the ASBR reactor configuration.

However, a noticeable decrease in  $q_{2CP}$  close to 37 and 84%, was determined at 140 mg 2CP-C/L and 196 mg 2CP-C/L. Nevertheless, even with a decrease in the  $q_{2CP}$ , 2CP dehalogenation process was not affected.

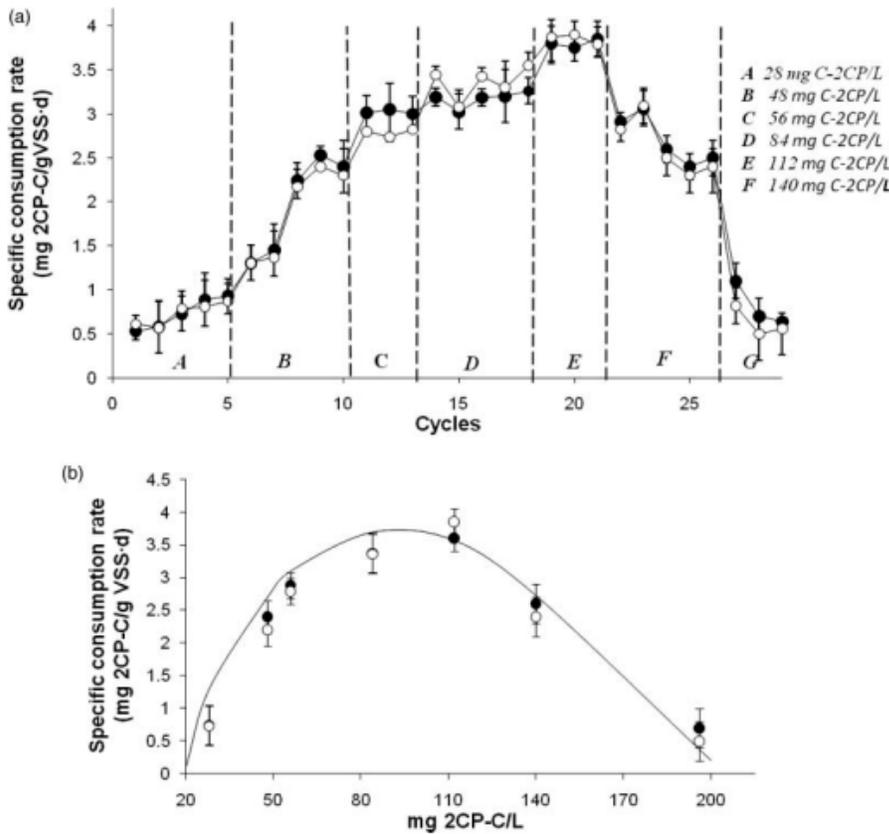


Figure 2 | (a) Profile of 2CP specific consumption rates obtained at different substrate concentration along the operational cycles. (b) Adjusting of the experimental data with the modified model of Han and Levenspiel,  $q_{2CP}$  in both reactors versus different initial concentrations. (•) ASBR<sub>A</sub> and (○) ASBR<sub>B</sub>.

The kinetic profile of the respiratory process when 2CP was increased to 196 mg 2CP-C/L with or without phenol (cycle 28) is illustrated in Figure 1(c) and (d). It was observed in both reactors that in contrast with the assays conducted at 84 mg 2CP-C/L, 2CP was totally consumed within 53 days. Likewise, phenol depletion required 63 days.

The transient accumulation of phenol registered in ASBR<sub>A</sub> and the longer time required for its consumption (in both reactors) could be linked to the effect of some chlorophenols in microbial communities or enzymatic activities. In this regard, some authors have suggested that syntrophic associations within the microbial communities are necessary to achieve the complete elimination of chlorophenols. Becker *et al.* (2005) reported in batch cultures with a concentration of 15 mg C-2CP/L the transient accumulation of 3-chlorobenzoate, phenol and benzoate. They associated the accumulation with a decreased of certain bacterial populations present in their cultures. Moreover, Dietrich & Winter (1990), reported during the treatment of 2CP in an AFBR (anaerobic fixed batch reactor) with an inoculum of enriched yeast extract and sugars as the electron donors, the

accumulation of phenol and a decrease in dehalogenation rate. They suggest that the phenol accumulation is due to an enzyme activity decrease, caused by 2CP concentration (1.1 g C-2CP/L). It is still unclear why the phenol accumulation takes place. Therefore further research is necessary.

The material balance at 196 mg 2CP-C/L indicated an important accumulation of VFA causing a diminishing of  $78 \pm 3\%$  in biogas production.

In the ASBR<sub>A</sub> reactor, 70% of VFA corresponded to valerate, 20% to propionate and 10% to acetate, whereas in the ASBR<sub>B</sub> reactor valerate and propionate values were 80 and 20%. It has been observed that in anaerobic communities, the metabolism of chlorophenols caused VFA accumulation and decrease in biogas production. Spnza & Cigal (2008), observed that the increase in the loading rate of 2,4 dichlorophenol (DCP) from 10.6 to 51 mg DCP-C/L-d increases the VFA production and accumulation. On the contrary it decreases biogas production and methanogenic population.

The kinetic parameters were obtained by adjusting the experimental data with the modified model of Han and Levenspiel (Vijayaraghavan *et al.* 1995). It resulted in a *K<sub>s</sub>*

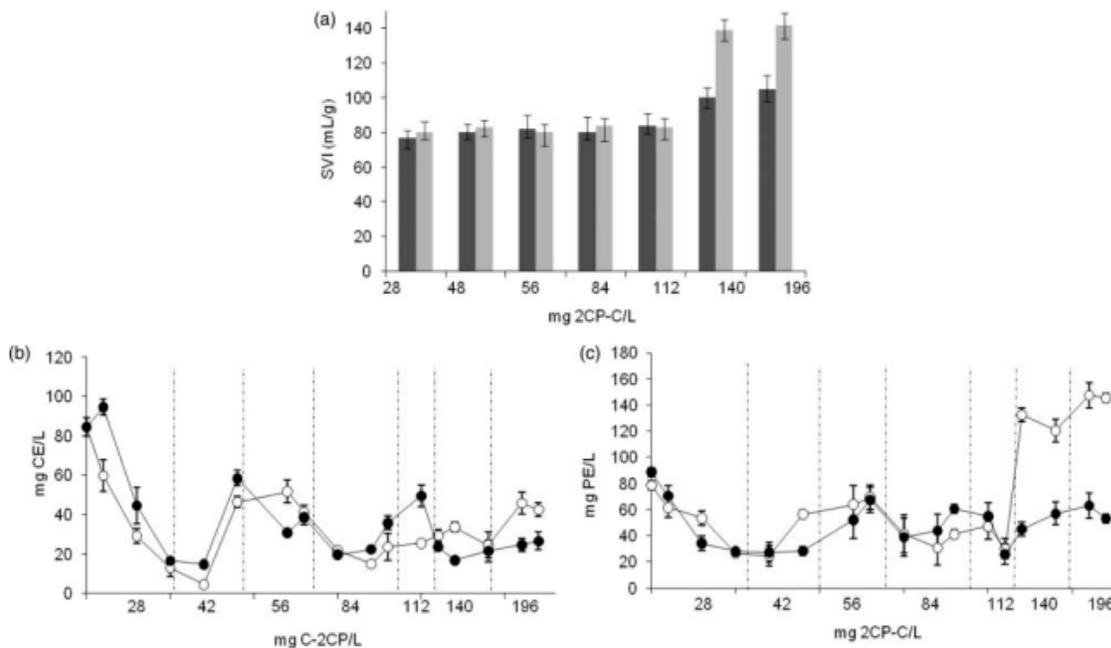


Figure 3 | (a) Sludge volume index profile in ASBR<sub>A</sub> (■) and ASBR<sub>B</sub> (□) reactors. Exopolymers substances profiles at the different 2CP concentrations, (b) carbohydrate exopolymers and (c) protein exopolymers. (●) ASBR<sub>A</sub> and (○) ASBR<sub>B</sub>.

(half saturation coefficient) of 85 mg 2CP-C/L,  $K_i$  (inhibition coefficient) of 180 mg 2CP-C/L and  $q_{Smax}$  of 3.75 mg 2CP-C/g VSS d (Figure 2(b)).

The low affinity of the microbial consortium at 2CP is reflected in the  $K_s$  value. Nevertheless, this value is similar to that obtained by Dwyer *et al.* (1986) with an immobilized methanogenic consortium fed with phenol ( $K_s$  of 61 mg phenol-C/L). The  $K_i$  calculated is higher than the one obtained by Nalbur & Alkan (2007) during 2CP consumption with an aerobic consortium, which reported values of 170 mg 2CP-C/L.

### Sludge settleability

Sludge settleability in terms of  $SVI_{0.1}$  was monitored in both ASBRs during experimentation (Figure 3(a)). Good settlement characteristics were observed in ASBR<sub>A</sub> reactor when 2CP concentration ranged from 28 mg 2CP-C/L to 196 mg 2CP-C/L as  $SVI$  values between 35 and  $105 \pm 5$  mL/g were registered. It is known that  $SVI$  values lower than 100 mL/g indicate sludge with good settling characteristics (Dangcong *et al.* 1999). However, sludge flotation was observed in ASBR<sub>B</sub> reactor when 140 mg 2CP-C/L and 196 mg 2CP-C/L were assayed. At these conditions  $SVI$  values were  $\geq 135 \pm 5$  mL/g. As a consequence, sedimentation time in ASBR<sub>B</sub> was increased to 8 h in order to avoid sludge washout from the reactor.

It has been suggested that the exopolymeric substances (EPS) are responsible for maintaining the structure and stability of the sludge. There has also been reported a relationship between poor sludge settling properties and the increase in EPS, particularly in exopolymeric proteins (EP) content (Cuervo-López *et al.* 1999; Martínez *et al.* 2004). Therefore, EPS behavior was determined in both reactors (Figure 3(b) and (c)). During the experimentation, a similar diminishing tendency in exopolymeric carbohydrates (EC) concentration can be observed in both reactors (Figure 3(b)). In contrast, a significant increase in EP from  $30 \pm 4.3$  to  $133 \pm 5.3$  mg EP/L was observed in ASBR<sub>B</sub> reactor at 140 and 196 mg 2CP-C/L (Figure 3(c)), whereas EP content behavior remained stable in ASBR<sub>A</sub>. The EP increase in ASBR<sub>B</sub> was probably caused by the high concentration of phenol and 2CP. Oscillatory behavior in SEP pattern was also obtained which agrees with that reported by Martínez *et al.* (2004), for nitrifying sludge. These results suggest that the poor sludge settling properties were mainly related to the increase in EP rather than the change in EC content.

### CONCLUSIONS

Under anaerobic conditions, the 2CP consumption was achieved in presence and absence of phenol (ASBR<sub>A</sub> and ASBR<sub>B</sub>). The 2CP consumption efficiency and the methane yield production were not influenced by the increase from 28 mg 2CP-C/L to 140 mg 2CP-C/L, as these values remained close to  $90 \pm 0.4\%$  and  $0.8 \pm 0.04$ , in both ASBR reactors. An increase of five times in  $q_{2CP}$  values was observed between 28 mg 2CP-C/L and 112 mg 2CP-C/L whereas the sludge remained with good settlement characteristics no matter the 2CP concentration. An accumulation of valerate and propionate was observed at 140 and 196 mg 2CP-C/L, with a decrease in  $q_{2CP}$  by 37 and 72% in both reactors. Likewise, an increment in exopolymeric protein concentration and a decrease in sludge settlement capacity were obtained in ASBR<sub>B</sub> reactor at 140 and 196 mg 2CP-C/L.

The use of an ASBR reactor can be an attractive tool for the treatment of aromatic compounds owing to the sludge acclimation period being shorter. The 2CP consumption can also be carried out without the addition of an electron donor. This type of reactor could be successfully used for the treatment of up to 280 mg C-aromatic compound/L.

### ACKNOWLEDGEMENTS

This project was sponsored by SEP-CONACYT CB-2005-C01-49748-2. We thank Midori Lorenzana-Rivero by the English review.

### REFERENCES

- APHA/AWWA/WEF 1998 *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20th edition. American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington, DC, USA.
- Armenante, P. M., Kafkewitz, D., Lewandowski, G. A. & Jou, C. J. 1999 Anaerobic-aerobic treatment of halogenated phenolic compounds. *Water Res.* **33**, 681-692.
- Basu, S. K., Oleszkiewicz, J. A. & Sparling, R. 1996 Dehalogenation of 2-chlorophenol in anaerobic batch cultures. *Water Res.* **30**, 315-322.
- Becker, J. G., Berardesco, G., Rittmann, B. E. & Stahl, D. A. 2005 The role of syntrophic associations in sustaining anaerobic mineralization of chlorinated organic compounds. *Environ. Health Perspect.* **113** (3), 310-316.
- Beristain-Montiel, L., Gómez-Hernández, J., Monroy-Hermosillo, O., Cuervo-López, F. & Ramírez-Vives, F. 2010

- Methanization and mineralization of 2-chlorophenol by anaerobic digestion. *Water Sci. Technol.* **62**, 1791–1798.
- Bhatt, P., Kumar, S. M., Mudliar, S. & Chakrabarti, T. 2007 Biodegradation of chlorinated compounds – a review. *Critical Rev. Environ. Sci. Technol.* **37**, 165–198.
- Chang, C. C., Tseng, S. K., Chang, C. C. & Ho, C. M. 2003 Reductive dechlorination of 2-chlorophenol in a hydrogenotrophic gas-permeable, silicone membrane bioreactor. *Bioresour. Technol.* **90**, 323–328.
- Cuervo-López, F., Martínez, F., Gutierrez-Rojas, M., Noyola, R. A. & Gómez, J. 1999 Effect of nitrogen loading rate and carbon source on denitrification and sludge settleability in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. *Water Sci. Technol.* **40** (8), 123–130.
- Dangcong, P., Bernet, N. & Moletta, R. 1999 Aerobic granular sludge: a case report. *Water Res.* **33**, 890–893.
- Dietrich, G. & Winter, J. 1990 Anaerobic degradation of chlorophenol by an enrichment culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**, 253–258.
- Dubois, M., Illes, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. & Smith, F. 1956 Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* **28**, 350–356.
- Dwyer, F. D., Krumme, L. M., Boyd, S. A. & Tiedje, M. J. 1986 Kinetics of phenol biodegradation by an immobilized methanogenic consortium. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**, 345–351.
- Elmen, J., Pan, W., Leung, S. Y., Magyarosy, A. & Keasling, J. D. 1997 Kinetics of toluene degradation by a nitrate-reducing bacterium isolated from a groundwater aquifer. *Biotechnol. Bioeng.* **55**, 82–90.
- Häggbloom, M. & Bossert, D. 2003 *Dehalogenation: Microbial Processes and Environmental Applications*. Kluwer Academic Publishers, New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow.
- Häggbloom, M. M., Rivera, M. D. & Young, L. Y. 1995 Influence of alternative electron acceptors on the anaerobic biodegradability of chlorinated phenols and benzoic acids. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 1162–1167.
- Hu, Z., Ferraina, J. F., Ericson, A. A. & Mackay, B. F. 2005 Biomass characteristics in three sequencing batch reactors treating a wastewater containing synthetic organic chemicals. *Water Res.* **39**, 710–720.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. 1951 Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265–275.
- Majumder, P. S. & Gupta, S. K. 2007 Removal of chlorophenols in sequential anaerobic-aerobic reactors. *Bioresour. Technol.* **98**, 118–119.
- Martínez, O., Lema, J., Méndez, R., Cuervo-López, F. & Gómez, J. 2004 Role of exopolymeric protein on the settleability of nitrifying sludges. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **87**, 177–187.
- Monsalvo, V. M., Mohedano, A. F., Casas, J. A. & Rodríguez, J. J. 2009 Cometabolic biodegradation of 4-chlorophenol by sequencing batch reactors at different temperatures. *Bioresour. Technol.* **100**, 4572–4578.
- Moreno, A. I. & Buitrón, G. 2004 Influence of the origin of the inoculum and the acclimation strategy on the degradation of 4-chlorophenol. *Bioresour. Technol.* **94**, 215–218.
- Nalbur, B. E. & Alkan, U. 2007 The inhibitory effects of 2CP and 2,4 DCP containing effluents on sequencing batch reactors. *Inter. Biodet. Biodegradation* **60**, 178–188.
- Sahinkaya, E. & Dilek, F. B. 2006 Effect of biogenic substrate concentration on the performance of sequencing batch reactor treating 4-CP and 2,4-DCP mixture. *J. Hazard. Mat.* **128**, 258–264.
- Sierra-Alvarez, R. & Lettinga, G. 1990 The effect of aromatic structure on the inhibition of acetoclastic methanogenesis in granular sludge. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**, 544–550.
- Sponza, D. T. & Cigal, C. 2008 Relationships between anaerobic consortia and removal efficiencies in an UASB reactor degrading 2,4 dichlorophenol (DCP). *J. Environ. Manag.* **87**, 177–92.
- Tartakovsky, B., Miguez, C. B., Petti, L., Bourque, D., Groleau, D. & Guiot, S. R. 2001 Tetrachlorethylene dechlorination using a consortium of methanogenic and methanotrophic bacteria coimmobilized. *Enz. Microbiol. Technol.* **22**, 255–260.
- Tomei, M. C., Annesini, M. C., Luberti, R., Cento, G. & Senia, A. 2003 Kinetics of 4-nitrophenol biodegradation in a sequencing batch reactor. *Water Res.* **37**, 3803–3814.
- Vijayaraghavan, S., Srinivasaraghavan, T., Musti, S., Kar, S., Swaminathan, T. & Baradarajan, A. 1995 Biodegradation of phenol by arthrobacter and modelling of the kinetics. *Bioprocess Eng.* **12**, 227–229.
- Xiangwen, S., Dangcong, P., Zhaohua, T. & Xinghua, J. 2008 Treatment of brewery wastewater using anaerobic sequencing batch reactor (ASBR). *Bioresour. Technol.* **99** (8), 3182–3186.
- Zaiat, M., Rodrigues, J. A. D., Ratusznei, S. M., Camargo, E. F. M. & Borzani, W. 2001 Anaerobic sequencing batch reactors for wastewater treatment: a developing technology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **55** (1), 29–35.

Q4

First received 28 February 2011; accepted in revised form 12 May 2011

## 6. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE 2-CLOROFENOL (2CP) EN LA DINÁMICA POBLACIONAL EN UN REACTOR ANAEROBIO DE LOTE SECUENCIADO (ASBR)

En este capítulo se presentan los resultados del efecto del 2-clorofenol (2CP) sobre la dinámica poblacional del cultivo en los reactores anaerobios de lote secuenciado (ASBR). Al igual que el capítulo anterior, éste se presentará en forma de artículo de investigación. Próximamente se enviará a revisión para su publicación. A continuación se presenta el resumen.

Resumen del artículo: **Effect of 2-Chlorophenol (2CP) concentration in the population dynamics in a sequencing batch anaerobic reactor (ASBR)**. Lizeth Beristain-Montiel, Sergio Martínez-Hernández, Flor de María Cuervo-López, Florina Ramírez-Vives.

El presente estudio pretende contribuir al conocimiento sobre la dinámica de poblaciones bacterianas involucradas en la degradación anaerobia del 2-Clorofenol (2CP) y su relación con el proceso respiratorio en un reactor anaerobio de lote secuenciado (ASBR). El estudio se llevó a cabo en dos reactores anaerobios de lote secuenciado con diferentes concentraciones de carbono (ASBR<sub>A</sub> and ASBR<sub>B</sub>). El reactor ASBR<sub>A</sub> fue operado únicamente con 2CP y el reactor ASBR<sub>B</sub> con una mezcla de 2CP y fenol como donador de electrones. La dinámica poblacional fue evaluada por electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE) y el proceso respiratorio se evaluó por medio de eficiencias de consumo de sustrato ( $E_{2CP}$ ), rendimientos de producción de biogás ( $Y_{biogas-C2CP-C}$ ) y velocidades específicas de consumo de sustrato ( $q_{2CP}$ ) como variables de respuesta.

Ambos reactores mantuvieron eficiencias de consumo del 90%, independientemente de la concentración de las fuentes de carbono, esto puede estar relacionado con el balance en las poblaciones microbianas presentes sugerido por el índice ecológico ( $J= 0.97 \pm 0.2$ ) *Pseudomonas* fue el género bacteriano presente bajo todas las condiciones de cultivo, sugiriendo ser el principal responsable de la deshalogenación del 2CP, como lo reportan (Yee et al., 2000; Farrell y Quilty

2002). El incremento en la  $q_{2CP}$  a partir de la concentración de 42 mgC-2CP/L puede estar relacionado con la presencia de *U. Caulobacter*, *R. lindaniclasticus* y *Uncultured Chloroflexi bacterium* ya que son bacterias que han sido asociadas con el consumo de compuestos aromáticos halogenados o productos de su metabolismo como lo reportan (Riviere et al., 2009; Manickam et al., 2006). Se presentó la acumulación de fenol y AGV en la concentración de 196 mg C-2CP/L, la cual puede estar asociada con la desaparición de las bandas relacionadas con bacterias *Caulobacter* y *Bacillus* que han sido reportadas como consumidoras de fenol (Wang et al., 1995) y como bacterias hidrolíticas-acidógenas (Bertin et al., 2010) respectivamente. Se observó la disminución del 78% en  $Y_{biogas-C/2CP-C}$  en ambos reactores a 196 mg C-2CP/L lo que probablemente esté relacionado con dos factores: la disminución de poblaciones metanogénicas reflejado en los índices ecológicos S y J o a la ausencia de sustratos necesarios para llevar a cabo la metanogénesis. La presente investigación da evidencias de la necesidad de las asociaciones sintróficas para la mineralización del 2CP en reactores ASBR.

## Effect of 2-Chlorophenol (2CP) concentration on the dynamic of a microbial community in an anaerobic sequencing batch reactor (ASBR)

Lizeth Beristain-Montiel, Sergio Martínez-Hernández, Flor de María Cuervo-López, Florina Ramírez-Vives\*

\*Department of Biotechnology, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Av San Rafael Atlixco 186, Vicentina, CP 09340 Mexico City  
(E-mail: frav@xanum.uam.mx)

### Abstract

The aim of this study is to contribute to the knowledge about the dynamic of the microbial community involved in anaerobic degradation of 2-Chlorophenol (2CP) and its relationship with the respiratory process in a sequencing batch anaerobic reactor (ASBR). Two reactors were set up (ASBR<sub>A</sub> and ASBR<sub>B</sub>). The ASBR<sub>A</sub> was fed with 2-chlorophenol (28-196 mg 2CP-C/L). The ASBR<sub>B</sub> was fed with a mixture of 2CP (28-196 mg 2CP-C/L) and phenol (28-196 mg Phenol-C/L) as an electron donor. The dynamic of the microbial community was evaluated by denaturant gradient gel electrophoresis (DGGE). The respiratory process was evaluated by means of substrate consumption efficiency ( $E_{2CP}$ ), biogas yield ( $Y_{biogas-C/2CP-C}$ ) and by the specific consumption rates ( $q_{2CP}$ ) as response variables. The high consumption efficiency (90%), at all concentration tested may be related with the evenness of microbial populations (J index =  $0.97 \pm 0.2$ ) present in both reactors. *Pseudomonas* genus was present in all concentrations tested, suggesting a possible relationship with the dehalogenation observed in both reactors. At 42 mg C-2CP/L it was observed the presence of bands related to *U. Caulobacter*, *R. lindaniclasticus* and *Uncultured Chloroflexi bacterium*. These microorganisms could be related with the increase in  $q_{2CP}$ . Accumulation of phenol and volatile fatty acids was observed at 196 mg 2CP-C/L, these results might be associated with the disappearance of the bands related to *Caulobacter* and *Bacillus*. The biogas yields were constant during the concentrations evaluated in both reactors. The decrease in  $Y_{biogas-C/2CP}$  at 196 mg 2CP-C/L, was probably related to the disappearance of fermentative or acetogenic bacteria, which resulted in a diminishing of substrates necessary to carry out methanogenesis, and eventually caused the decline in methanogenic populations present (S and J indices).

### Keywords

2-Chlorophenol (2CP); phenol; anaerobic digestion; population dynamics.

## INTRODUCTION

Chlorophenols are widely used as wood preservatives, pesticides, herbicides, biocides and colorants (Majumder and Gupta, 2007). The widespread use of these compounds has a negative impact on public health due to their carcinogenic and mutagenic characteristics (Bhatt et al., 2007). The 2-chlorophenol (2CP) may be formed as an intermediary in the biodegradation of highly substituted chlorophenols or during chlorination of wastewater (Majumder and Gupta, 2007). The 2CP is within the list of main pollutants of the environment protection agency (EPA) for its inherent toxicity, recalcitrance and accumulation (Bhatt et al., 2007).

The reductive dehalogenation is a stage in the pathway of chlorophenols elimination or degradation in which the halogens are removed from the molecule resulting in less toxic compounds or easily degradable metabolites. This process can occur under aerobic or anaerobic conditions, although it has been observed more frequently in strictly anaerobic environments (Hägglom and Bossert 2003).

The complete mineralization of chlorinated compounds has been observed in methanogenic and sulfate reductive conditions. The evidence suggests that, under methanogenic conditions is necessary to involve multiple populations due to the reductive dehalogenation precede the complete mineralization of chlorinated compounds (Hägglom and Bossert 2003).

It has been reported that phenol and benzoate are intermediates produced by dehalogenating microorganisms during the biotransformation of monochlorophenols (Hägglom and Bossert 2003). Benzoate can be transformed to acetate, H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> by syntrophic microorganisms under fermentative conditions. These substrates are used by methanogenic populations (archaea) for CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> production (Becker et al., 2001). So far, the population of the domain archaea has not been associated with the reductive dehalogenation of chlorinated compounds (Hägglom and Bossert 2003).

In a methanogenic consortium able to mineralize 3-Chlorobenzoate (3CB), Reineke and Knackmuss (1988), reported the presence of a benzoate-oxidizing bacterium and two H<sub>2</sub>-consuming methanogens. Considering the complete mineralization of monochlorophenols, the syntrophic activities of the microorganisms involved in anaerobic digestion are as important

as the dehalogenating microorganisms. The microbial communities have been characterized using molecular techniques such as polymerase chain reaction (PCR)/denaturant gradient gel electrophoresis (DGGE), due to they can estimate the bacterial diversity over time. However, studies about 2CP mineralization in ASBR reactor and its relationship with the dynamic population of the cultures are scarce. Thus, this work is focused on integrating the behavior of methanogenic respiratory process at different concentrations of 2CP and the population dynamics of the microbial community along the ASBR operation.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Kinetic assays in anaerobic sequencing batch reactors (ASBR)**

Two ASBR reactors (ASBR<sub>A</sub> and ASBR<sub>B</sub>) with an operation volume of 1.3 L, inoculated with  $3.5 \pm 0.21$  g VSS/L of methanogenic sludge were set up as reported by Beristain et al. (In press). ASBR<sub>A</sub> was fed with different concentrations of 2CP (2CP-C mg/L: 28, 42, 56, 84, 112, 140 and 196) and ASBR<sub>B</sub> with a mixture of 2CP (mg 2CP-C/L: 28, 42, 56, 84, 112, 140 and 196) and phenol (mg Phenol-C/L: 28, 42, 56, 84, 112, 140 and 196) as the electron donor. Concentrations were increased when the specific consumption rates were stabilized, which occurred between the third and fifth cycle of operation at each concentration. In order to evaluate the population dynamics, samples were taken in the last cycle of operation for each concentration tested.

### **Evaluation of respiratory behaviour**

The respiratory behavior of sludge was evaluated from the data obtained in the kinetic assays by means of consumption efficiencies ( $E$ , mg substrate consumed/mg substrate fed), yield products ( $Y$ , mg product/mg substrate consumed) and substrate specific consumption rates ( $q_S$ , mg of substrate consumed/mg VSS·d). The substrate specific consumption rate was calculated using the equation  $q_S = dS/dt \times 1/X$ , in which  $S$  is the substrate concentration (mg/L),  $t$  is time (d), and  $X$  is the biomass concentration in the culture (mg of VSS/L). The slope values obtained during the lineal phase consumption represent the  $q_S$  values as reported by Elmen et al. (1997).

## **Analytical Methods**

The VFA concentration was measured by gas chromatography, while the concentration of 2CP and phenol was determined by HPLC as reported by Beristain et al. (2010). The organic and inorganic carbon was analyzed in a total organic carbon (TOC) analyzer (Shimadzu, TOC-5000A, Australia) as reported by Cuervo-López et al., (1999). Total and volatile suspended solids (TSS, VSS) contents were determined at the end of each assay following standard methods (APHA, 1998). For each analytical method, standard curves were performed by triplicate. In all cases, the variation coefficient was less than 10%.

## **Microbial analysis**

In order to determine the diversity of the bacteria and archaea communities present in reactors ASBRA and ASBRB, denaturant gradient gel electrophoresis (DGGE) and sequencing methods were used.

### *DNA extraction and 16S rRNA gene amplification*

Duplicate samples were taken (0.5 g of sludge) of both reactors (ASBRA and ASBRB) in the last cycle of operation for each concentration tested. The samples were centrifuged at 14,000 rpm for 10 minutes and frozen at -20 ° C until DNA extraction.

DNA was extracted using a UltraClean™ Soil DNA Isolation (MO BIO Laboratories, Carlsbad, CA, USA). The amount and yield of DNA was verified by electrophoresis on agarose gel 2% (w/v) at 90 volts (V) for 1 hour. The V2-V3 region of 16S rRNA archaeal genes was amplified using primers A109 (T)-f (5'-ACTGCTCAGTAACACGT-3') and 515r (5'-ATCGTATTACCGCGGCTGCTGCTGGCAC-3') with clamp (Grosskopf et al., 1998). 16S-rRNA genes were amplified using the following thermocycling program; pre-denaturation at 95°C for 5 min; 35 cycles of denaturation at 95°C for 30s, annealing at 53°C for 40s and elongation at 72°C for 60s; post-elongation at 72°C for 7 min (García-Saucedo et al., 2008). The V6-V8 region of 16S rRNA bacterial genes were amplified using primers 968-f (5'-GAACGCGAAGAACCTTACC-3 ') with clamp and 1401-r (5'CGGTGTGTACAAGAC CC-3') (Nübel et al., 1996). 16S-rRNA genes were amplified using the following thermocycling program; pre-denaturation at 94°C for 2 min; 30 cycles of denaturation at 94°C for 45s, annealing at 60°C for 30s and elongation at 72°C for 90s; post-elongation at 72°C for 10 min (García-Saucedo et al., 2008). The clamp used for DGGE consisted of a 40

bp sequence (5'CGCCCGGGGCGCGCCCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGG-3'). The PCR was performed in a thermocycler CG1-96 (Corbett Research, Sydney, Australia), the reaction mixture for PCR consisted of (mL): 2.5 for each primary (20 mM), 1 mixture of nucleotides (10 mM per nucleotide), 10 buffer (10X), 5 MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0.5 of Taq DNA polymerase (5u/μL), 1 DNA slugde and 27.5 sterile water.

#### *Denaturant gradient gel electrophoresis (DGGE)*

Amplification products were separated by DGGE in a universal DCode mutation detection system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) at 60 ° C. Initially received 200 V for 5 minutes and then 85V for 16 hours, according to the procedure described by García-Saucedo et al., (2008). Polyacrylamide gels were used at 6% (w/v) and a denaturant gradient from 42 to 58% for archaeas and from 38 to 53% for bacteria. DGGE gels were stained with silver nitrate and scanned using an Epichemi3 photodocumented Darkroom (UVP Biolmaging Systems, Upland, CA).

#### *Purification and sequencing of 16S rRNA bands*

The most representative bands of DGGE gel were excised and reamplified using the primers listed above. The PCR products were purified (Wizard® SV gel and PCR clean-up system, Promega, Madison, WI, USA), visualized by agarose gel electrophoresis and sequenced using ABI Prism Big-Dye Terminator 3.1 Ready Reaction Cycle Sequencing on an ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Warrington, UK). The DNA sequences were analyzed using Chromas (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>) and BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) programs. Phylogenetic affiliations of the partial sequences were estimated using the program Basic Local Alignment Search Tool BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) (McGinnis & Madden, 2004). Phylogenic trees of the 16S rRNA gene sequences of DGGE fragments (*Escherichia coli* positions 110 to 482 and 969 to 1367) were constructed using neighbor-joining method as implemented in MEGA4 software (<http://www.megasoftware.net>) (Tamura et al., 2007).

Species richness (S), structural diversity (H), and evenness (J) of the microbial community were estimated. Structural changes were analyzed by means of the J index because it reflects an overview of the predominance of species within a microbial community. The J index was

calculated as  $J = H/\ln S$ . The term H is defined as  $H = -\sum P_i \ln P_i$ , where  $P_i$  is the relative abundance of the bands in a lane and is calculated as  $P_i = n_i/N$ ,  $n_i$  is the band intensity for individual bands, and N is the sum of intensities of bands in a lane. The richness index S represents the total number of bands in a lane. Determination of all indices was based on the DGGE profiles. Each band within a profile was considered a fragment of a different microbial population, while bands with similar migration positions in different profiles were considered fragments of the same population (Martinez et al., 2009). The relation between the surface area of a band and the mean pixel intensity of that area was considered the intensity of the band and calculated using the image analysis program Image J (public-domain image processing and analyzer program), developed at the National Institutes of Health.

**RESULTS AND DISCUSSION**

Some differences in position, intensity and number of bands in the gels (Fig. 6.1) were analyzed by calculating ecological indices. Structural changes were analyzed in terms of J and S indices because it takes into account the diversity and richness of the microbial community. The J index reflects the predominance of species in a microbial community (Martinez et al., 2009). The numerical limit of this index is between 0 and 1, where a value of 0 represents the dominance of certain species and 1 represents a perfect evenness population in the community. The S index reflects the richness of species in the community. The values of H and S were used to obtain the J index. All these estimated values are reported in Table 6.1.

**Table 6.1. Species richness (S), structural diversity (H), and evenness (J) indices of microbial community in both ASBR.**

		Reactor ASBR <sub>A</sub> (mg 2CP-C/L)							Reactor ASBR <sub>B</sub> (mg 2CP-C/L and mg C-Phenol /L)						
<b>BACTERIA</b>															
Index	Inoculum	28	42	56	84	112	140	196	28	42	56	84	112	140	196
S	7	6	14	13	14	11	12	9	5	9	14	12	15	15	5
H	1.93	1.68	2.59	2.31	2.62	2.35	2.43	2.06	1.61	2.09	2.47	2.42	2.55	2.63	1.56
J	0.99	0.98	0.97	0.98	0.99	0.96	0.98	0.98	0.99	0.95	0.95	0.97	0.95	0.97	0.97
<b>ARCHAEA</b>															
S	6	5	4	4	5	4	4	2	5	4	4	5	4	4	1
H	1.76	1.57	1.35	1.36	1.36	1.37	1.34	0.67	1.57	1.36	1.23	1.57	1.37	1.34	0
J	0.98	0.97	0.97	0.99	0.98	0.99	0.96	0.97	0.98	0.98	0.99	0.98	0.99	0.97	0

In both reactors the *S* values (species richness) for the Bacteria domain shown a tendency to increase as the concentration of phenolic compounds was increased from 42 to 140 mg C-2CP/L. In contrast, a decrease of 35 and 68% in the *S* index was respectively observed in the ASBR<sub>A</sub> and ASBR<sub>B</sub> at 196 mg 2CP-C/L. The decrease in *S* values might be related to the accumulation of intermediates observed at this concentration (Fig 6.3). No significant changes in the *S* values of the Archaea domain were observed in the range from 42 to 140 mg C-2CP/L, however, a decrease of 60 and 75% in the *S* index was respectively observed in the ASBR<sub>A</sub> and ASBR<sub>B</sub> at 196 mg 2CP-C/L. The results obtained in this work suggest that there was a relationship between the decrease in biogas yield production (table 6.3) and the disappearance of most of the populations of Archaea (table 6.2).

For the Bacteria domain, *J* values (close to 1) suggest that these cases (28-196 mg C-2CP/L) resulted in microbial populations roughly similar among them, although the bands were not necessarily the same. The high consumption efficiency observed at all concentration tested (90%), might be related to the perfect evenness of microbial populations present in both reactors. These results are consistent with those reported by Martinez et al. (2009), where negligible changes in community structure of bacteria were observed at different operational conditions. Although in the Archaea domain at ASBR<sub>B</sub>, the *J* value decreased (0) at the highest concentration evaluated, suggesting the dominance of certain species.

The most representative bands obtained from DGGE were sequenced. Phylogenetic trees of the main bacteria were constructed based on 16SrRNA gene sequences and reference sequences (Fig. 6.2a). The sequences were grouped in the following orders: Gamma proteobacteria (41%), Bacilli (25%), Alphaproteobacteria (8.3%), Acidobacteria (8.3%), Chloroflexi (8.3%) and Xhantomonadales (8.3%). The main microorganisms found in both reactors were identified by their relationship with some bacteria (Table 6.2). The microbial analysis of the inoculum and sludge samples obtained during all concentrations tested in both reactors showed, the presence of bacteria (Band A and B) related to *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas mendocina* (98 and 90% similar to the gene sequence-based 16S-rRNA). It has been reported that *Pseudomonas* genus, are able to consume a wide variety of recalcitrant compounds (Nelson et al., 2002; Farrell y Quilty, 2002; Yee et al., 2000).

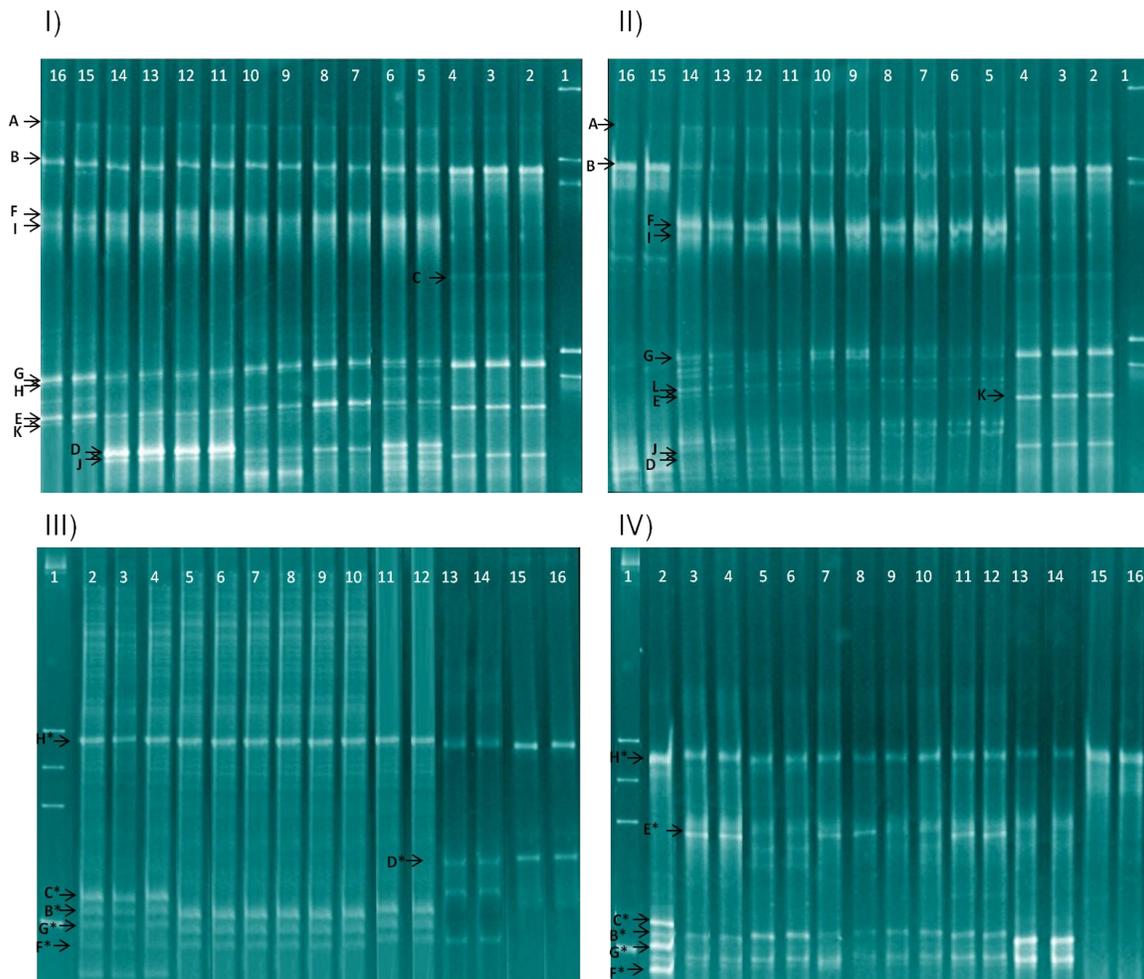


Figure 6.1 DGGE profiles of 16S rRNA amplicons in respiratory steady state. Bacteria (I) ASBR<sub>A</sub>, (II) ASBR<sub>B</sub>. Archaeal (III) ASBR<sub>A</sub>, (IV) ASBR<sub>B</sub>. Identified DGGE bands are labeled to the left. Samples from ASBR reactor (lane 1) marker, (lane 2) inoculum, (lane 3,4) 28 mg C-2CP/L, (lane 5,6) 42 mg C-2CP/L, (lane 7,8) 56 mg C-2CP/L, (lane 9,10) 84 mg C-2CP/L, (lane 11,12) 112 mg C-2CP/L, (lane 13,14) 140 mg C-2CP/L, (lane 15,16) 196 mg C-2CP/L.

It has been found that in aerobic and anaerobic conditions *P. putida*, can metabolize aromatic compounds into substrates that can feed the central pathways (Nelson et al., 2002). Farrell and Quilty (2002) reported that under aerobic conditions in batch cultures, *P. putida* is able to degrade up to 112 mg 2CP-C/L, but not at 169 mg C-2CP/ L. Also, *P. mendocina* has been reported that in anaerobic cultures is able to increase the reductive dehalogenation (Yee et al., 2000). In this work, the presence and permanence of the bands A and B (related to *P. putida* and *P. mendocina*), suggest a possible relationship between their metabolic activity and the high 2CP consumption efficiencies ( $E_{2CP}$ ) obtained in both reactors even at concentrations of up to 196 mg 2CP-C/L (Table 6.2). Bacteria of *Pseudomonas* genus associated with *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* and *P. quezannei* were observed, however its presence was only transient during the experiments. It was observed an increase of 5 times in the 2CP specific consumption rate ( $q_{2CP}$ ) in both reactors by increasing the concentration from 28 to 112 mg 2CP-C/L. In contrast, a decrease of 30 and 79% in the  $q_{2CP}$  was observed at 140 mg 2CP-C/L and 196 mg 2CP-C/L respectively (Table 6.3). In both reactors, the highest increase in  $q_{2CP}$  was obtained by increasing the concentration from 28 to 42 mg 2CP-C/L. From 42 mg 2CP-C/L and up to 140 mg 2CP-C/L, the bands D, E and F were observed. The sequencing analysis indicated that these bands correspond to bacteria related to *Uncultured Caulobacter*, *Rhodanobacter lindaniclasticus* and *Uncultured Cloroflexi bacterium*. These bacteria have been associated with the consumption of halogenated aromatic compounds or their metabolic products. For example, it has been reported that *Cloroflexi* which has been found in anaerobic environments, has a high potential for the dehalogenation due to its able to carry out the halorespiration (Li et al., 2010). It has been reported that *Rhodanobacter lindaniclasticus* contained enzymes for conducting the dehalogenation reaction, likewise, the presence of these microorganisms have been observed in lindane degrading cultures (Phillips et al., 2001). *Caulobacter* has also been isolated in cultures capable of degrading trichlorophenol, tetrachlorophenol and pentachlorophenol, moreover, it has been suggested the ability of these microorganisms for degrading p-hydroxybenzoate, phenol and benzoate as sole carbon and energy source (Wang et al., 2000). These compounds have been reported as the main products of reductive dehalogenation. Considering the kinetic results obtained in the present work, it is

possible to suggest a relationship between the increase in  $q_{2CP}$  and the presence of the populations related to *Uncultured Caulobacter*, *Rhodanobacter lindaniclasticus* and *Uncultured Cloroflexi bacterium* (band D, E and F) in the microbial consortium in both reactors.

In the ASBR<sub>A</sub> reactor which was only fed with 2CP, bands E and F were present along the entire experimentation. In contrast, in the ASBR<sub>B</sub> reactor, which was fed with the mixture of phenol and 2CP, these bands disappeared when a mixture of 196 mg C-Phenol/L and 196 mg C-2CP/L was added (table 6.2), suggesting that 196 mg C-Phenol/L exerted a negative effect for these two populations. The disappearance of the band D (related to *Uncultured Caulobacter*) in both reactors at 196 mg 2CP-C/L, may be associated with the transient accumulation of phenol detected in this stage of experimentation (table 6.2)

Table 6.2. Identification of nucleotide sequences analyzed from DGGE bands at all the concentrations tested in both ASBR reactors. Presence (+) and absence (-) of bands of Bacteria and Archaea.

		BACTERIA															
		Reactor ASBR <sub>A</sub> (mg 2CP-C/L)								Reactor ASBR <sub>B</sub> (mg 2CP-C/L and mg C-Phenol /L)							HOMOLOGY
BAND	CLOSEST RELATIVE IN GeneBank	Inoculum	28	42	56	84	112	140	196	28	42	56	84	112	140	196	(%)
A	<i>Pseudomonas putida</i> (DQ481482)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	98
B	<i>Pseudomonas mendocina</i> (GU596992)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	90
C	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (DQ306309)	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	97
D	Uncultured <i>Caulobacter</i> (GU563780)	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	97
E	<i>Rhodanobacter lindaniclasticus</i> (DQ370020)	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	96
F	Uncultured <i>Cloroflexi bacterium</i> (CU922566)	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	99
G	<i>Bacillus aurantiacus</i> (AJ605773)	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	79
H	Uncultured <i>acidobacteria bacterium</i> (CU921991)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	85
I	<i>Bacillus cereus</i> strain (FJ966973)	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	99
J	<i>Bacillus sp.</i> (HQ015742)	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	99
K	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (EF428995)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	81
L	<i>Pseudomonas quezenni</i> (AM922198)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	89
		ARCHAEA															
A*	Uncultured archaeon isolate (DQ27226)	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	98
B*	<i>Methanobacterium beijingense</i> (AY552778)	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	99
C*	Uncultured archaeon (AB447760)	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	95
D*	Uncultured methanobacteriales (CU916337)	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	87
E*	Uncultures euryarchaeote (GU969379)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	93
F*	<i>Methanosaeta concili</i> (X16932)	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	98
G*	Uncultured methanobacterium (DQ507195)	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	96
H*	<i>Methanosarcina barkeri</i> (AF028692)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	98

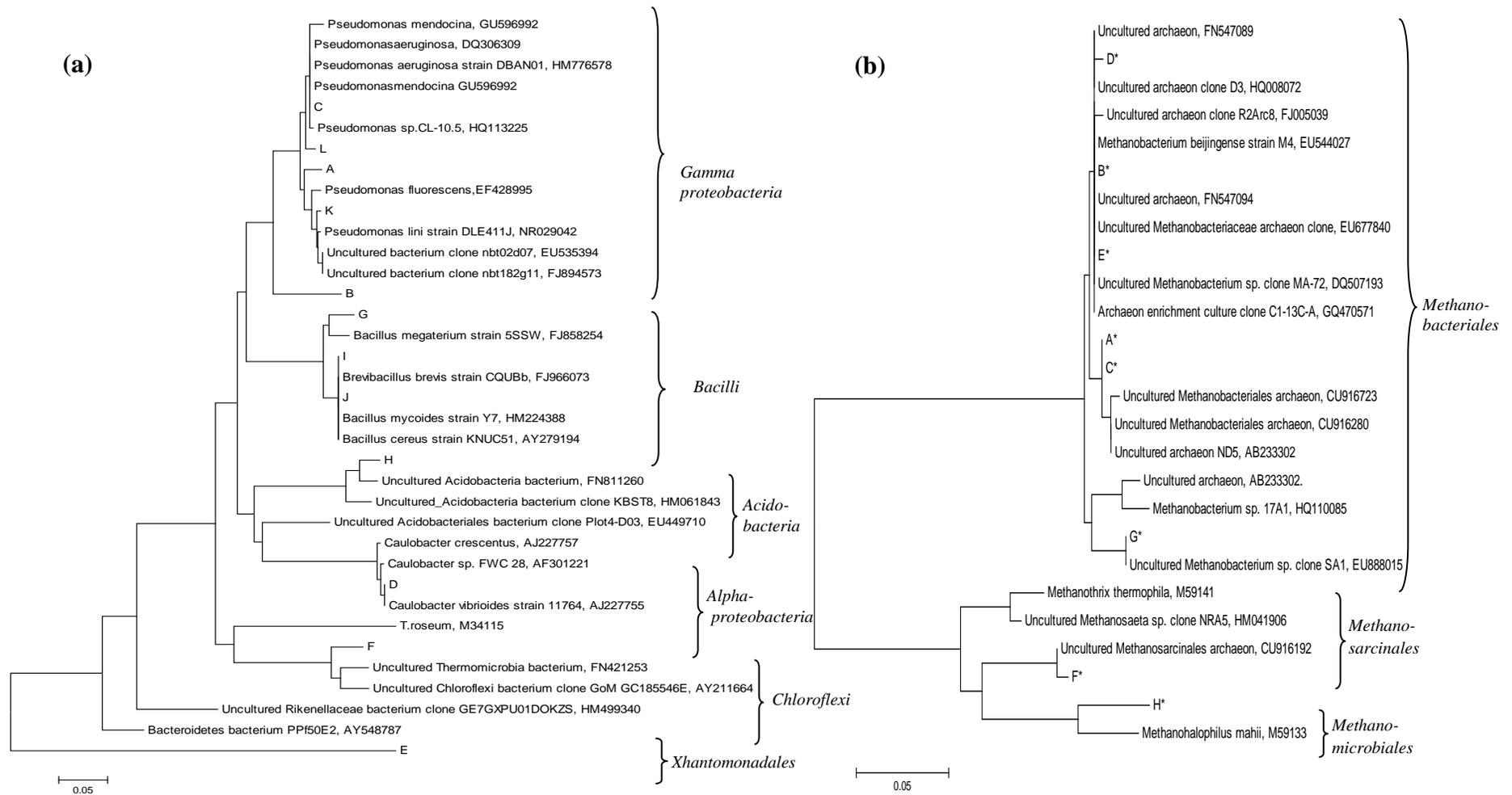


Fig. 6. 2 (a) Phylogenetic tree of the main bacteria present in both ASBR, (b) Phylogenetic tree of the main Archaea . Phylogenetic trees were generated based on the neighbor-joining method of the sequences of 16S rRNA-DGGE and taking as reference sequences from the databases.

Table 6.3. Specific consumption rate of 2CP, consumption efficiency and biogas production yield in the ASBR<sub>A</sub> (with 2CP) and ASBR<sub>B</sub> (with 2CP and Phenol) reactors at each concentration tested.

Concentration	Specific consumption rate <sup>a</sup>		Consumption efficiency <sup>b</sup>		Biogas yield <sup>c</sup>	
	ASBR <sub>A</sub>	ASBR <sub>B</sub>	ASBR <sub>A</sub>	ASBR <sub>B</sub>	ASBR <sub>A</sub>	ASBR <sub>B</sub>
28 mg 2CP-C/L (cycle 4)	0.73±0.17	0.73±0.13	90.6± 0.5	91.4±0.7	0.81±0.06	0.85±0.09
42 mg 2CP-C/L (cycle 9)	1.98±0.3	1.90±0.2	92.8±0.6	92±0.6	0.83±0.08	0.84±0.07
56 mg 2CP-C/L (cycle12)	3.02±0.2	2.78±0.15	91.6±0.4	90.8±0.4	0.83±0.07	0.84±0.08
84 mg 2CP-C/L (cycle 15)	3.17±0.1	3.35±0.08	91.3±0.6	92.3±0.5	0.84±0.05	0.82±0.05
112 mg 2CP-C/L (cycle 20)	3.8±0.2	3.85±0.15	90.4±1.3	92.5±0.6	0.83±0.02	0.87±0.08
140 mg 2CP-C/L (cycle 25)	2.69±0.17	2.62±0.13	92.3±2.6	93±1.9	0.80±0.04	0.80±0.05
196 mg 2CP-C/L (cycle 28)	0.81±0.2	0.62±0.1	89.2±2.3	93.5±3.0	0.18±0.05	0.22±0.08

<sup>a</sup>  $q_s$ , (mg C-2CP/g SSV·d)

<sup>b</sup>  $E$ , (mg C-2CP<sub>consumed</sub>/mg C-2CP<sub>feed</sub>)

<sup>c</sup>  $Y_{biogas-C/2CP-C}$  (mg C-biogas<sub>produced</sub>/mg C-2CP<sub>consumed</sub>)

Three bacteria related with the *Bacillus* genus (band G, I and J): *Bacillus aurantiacus*, *Bacillus cereus* strain and *Bacillus sp* were present in both reactors at concentrations from 28 or 42 mg 2CP-C/L and up to 140 mg 2CP-C/L, this genus has been classified as hydrolytic-acidogenic bacteria, considering their capability for hydrolyzing, fermenting and degrading volatile fatty acids (VFA) (Bertin et al., 2010). However, it is important to note that in the ASBR<sub>A</sub> reactor, only the bacterium related with *Bacillus cereus* strain (band N) remained throughout the experimentation. In fact, a mass balance conducted in this reactor at 196 mg 2CP-C/L indicated the accumulation of VFA (Fig. 6.3), which coincides with the disappearance of populations related to *Bacillus aurantiacus*, *Bacillus cereus* strain and *Bacillus sp*. During the ASBR<sub>A</sub> (without phenol) operation, the constant presence of bands H and K related with bacterium *Uncultured Acidobacteria bacterium* and *Pseudomonas*

*fluorescens* was observed. However, in the ASBR<sub>B</sub> from 42 mg Phenol-C/L disappeared these bacteria (band H and K), probably due to the presence of phenol.

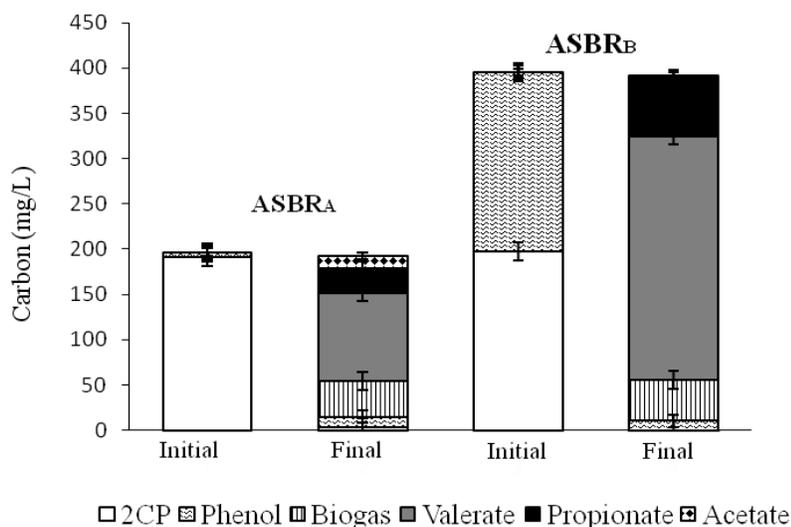


Fig 6.3 Mass balance at 196 mg C-2CP/L (cycle 27) in both reactors.

The decrease of bacterial populations responsible for consuming the intermediate products of 2CP metabolic pathway might result in the accumulation of phenol and VFA detected during the concentrations of 140 and 196 mg 2CP-C/L in both reactors.

Therefore, the decrease in the specific consumption rate observed during the concentrations of 140 and 196 mg 2CP-C/L in both reactors might be related with the disappearance of these bacterial populations (bands G, I, etc.). In fact, it has been reported that in order to maintain a certain 2CP specific consumption rate, there must be appropriate consumption of phenol (Hrudey et al., 1987). In this sense, Hilton and Archer (1988) observed a significant reduction in the 2CP consumption efficiency due to the accumulation of phenol.

The respiratory profile analysis in both reactors indicated that biogas yields ( $Y_{biogas-C/2CP-C}$ , mg C-biogas<sub>produced</sub>/mg C-2CP<sub>consumed</sub>) remained constant from 28 to 140 mg C-2CP/L (average  $Y_{biogas-C/2CP-C} = 0.8 \pm 0.06$ ). However, at 196 mg 2CP-C/L in both reactors a decrease in  $Y_{biogas-C/2CP-C}$  of 78% was observed (Table 6.3). Phylogenetic trees of the main Archaea were

constructed based on 16SrRNA gene sequences and reference sequences (Fig. 6.2b). The sequences were grouped in the following orders: *Methanobacteriales* (75%), *Methanosarcinales* (12.5 %) and *Methanomicrobiales* (12.5 %). In both reactors, at experimental concentrations between 28 to 140 mg C-2CP/L, it was detected two bands (F\* and H\*), which were related to *Methanosaeta concilii* and *Methanosarcina barkeri* (Table 2). Both bacteria have been found in anaerobic sludge and are reported to be the main consumers of acetate (acetoclastic). The rest of the bands (B\*, D\* and G\*) were identified as hydrogenotrophic (Table 6.2). For example, band B\* is related to *Methanobacterium beijingense*, a hydrogenotrophic Archaea which can use H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> and formate as substrates for methane production. Some bacteria related with *Methanobacterias* (band D\* and G\*) can use formate, CO or secondary alcohols to produce biogas.

When the concentration of the phenolic compounds (only 2CP and the mixture of phenol and 2CP) was increased to 196 mg 2CP-C/L most of the Archaea populations disappeared. Only the band related to *Methanosarcina barkeri* and the band related with *Uncultured Methanobacteriales* remained present (Table 6.2). It has been reported that *Methanosaeta* genus, only can used acetate for its metabolism. In contrast, it has been reported the presence of *Methanosarcina* genus in environments with high concentrations of VFA (Peng et al., 2008). The disappearance of the band F\* (corresponding to *Methanosaeta concilii*), during the last experimental concentration may be associated with the accumulation of propionate and valerate and the absence or low concentration of acetate observed at these conditions. On the other hand, the persistence of *Methanosarcina barkeri* at these conditions may be explained by the higher metabolic flexibility of this genus for using several substrates for methanogenesis.

The decrease in the biogas yield and the Archaea population can also be associated with two possibilities: i) the lack of substrate for conducting methanogenesis, considering that accumulation of long-chain VFA resulted in acetate concentrations close to zero; ii) the competition between reductive dehalogenation and methanogenesis for reduced equivalents (H<sub>2</sub>) (Becker et al., 2001).

## CONCLUSIONS

The high consumption efficiency (90%) obtained at the different 2CP and phenol concentrations might be related to the balance of microbial populations present in both reactors suggested by the ecological index J ( $0.97 \pm 0.2$ ). Bacteria associated with *P. putida* y *P. mendocina* were found at all phenolic concentrations and cycles of operation in both reactors. Considering the metabolic flexibility of these bacteria, they could be related with the dehalogenation of 2CP.

The increase in specific consumption rate obtained in the range between from 28 to 112 mg 2CP-C/L might be associated with the presence of bacteria related to *U. Caulobacter*, *R. lindaniclasticus* and *Uncultured Chloroflexi bacterium*. On the other hand, the decrease in the specific consumption rate observed at 140 and 196 mg 2CP-C/L in both reactors, may be associated with both the decrease of the population (S index) related to the consumption of phenol or a inhibition caused by the substrate concentrations evaluated. The accumulation of phenol and VFA observed at the concentration of 196 mg 2CP-C/L, could be linked to the absence of bands related to *Caulobacter* and *Bacillus*. Finally, according to the results obtained in this work the decrease in biogas production yields (78%) in both reactors, might be linked with: the absence of fermentative or acetogenic bacteria, which resulted in the absence of substrates for conducting methanogenesis and the eventually declination of these methanogenic populations (indicated by the decrease of S and J indices).

## REFERENCES

1. Bhatt P., Kumar S.M., Mudliar S., Chakrabarti T. (2007). Biodegradation of Chlorinated Compounds-A Review. *Critical Rev. Environ. Sci. Technol.* 37,165-198.
2. Becker J.G., Berardesco G., Rittmann B.E., Stahl D.A. (2001). Successional Changes in an Evolving Anaerobic Chlorophenol-Degrading Community Used To Infer Relationships between Population Structure and System-Level Processes. *Applied and environmental microbiology.* 67(12):5705,5714.

3. Beristain-Montiel L., Gómez-Hernández J., Monroy-Hermosillo O., Cuervo-López F., Ramírez-Vives F. (2010). Methanization and mineralization of 2-chlorophenol by anaerobic digestion. *Water Sci. Technol.* 62:1791–1798.
4. Bertin L., Lampis S., Todaro D., Scoma A., Vallini G., Marchetti L., Majone M., Fava F. (2010). Anaerobic acidogenic digestion of olive mill wastewaters in biofilm reactors packed with ceramic filters or granular activated carbon. *Water research* 45:3745-3749.
5. Elmen J., Pan W., Leung S. Y., Magyarosy A., Keasling J. D. (1997). Kinetics of toluene degradation by a nitrate-reducing bacterium isolated from a groundwater aquifer. *Biotechnol. Bioeng.* 55:82,90.
6. Farrell A., Bridge Q. (1999). Degradation of mono-chlorophenols by mixed microbial community via a meta-cleavage pathway. *Biodegradation.* 10: 353,362.
7. García-Saucedo C., Fernández F.J., Buitrón G., Cuervo-López F.M., Gómez J. (2008). Effect of loading rate on TOC consumption efficiency in a sulfate reducing process: sulfide effect in batch culture. *Journal of chemical technology and biotechnology.* 83(12): 1648,1657.
8. Grosskopf R., Janssen P.H., Liesack W. (1998). Diversity and structure of the methanogenic community in anoxic rice paddy soil microcosms as examined by cultivation and direct 16S rRNA gene sequence retrieval. *Applied and environmental microbiology.* 64: 960,969.
9. Häggblom M., Bossert D. (2003). *DEHALOGENATION Microbial Processes and Environmental Applications.* Kluwer Academic Publishers, New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow.
10. Hilton M.G., Archer D.B. (1988). Anaerobic digestion of a sulphate-rich molasses wastewater: Inhibition of hydrogen sulfide production. *Biotechnol. Bioeng.* 31: 885,888.
11. Hruday S.E., Knettig E. Fedorak P.M. (1987). Anaerobic degradation of monochlorophenols. *Environ. Technol. Lett.* 8: 65,76

12. Peng J., Lu Z., Rui J., Lu Y. (2008). Dynamics of the methanogenic archaeal community during plant residue decomposition in an anoxic rice field soil. *Applied and environmental microbiology*. 74(9): 2894, 2901.
13. Li Z., Yang S., Inoue Y., Yoshida N., Katayama A. (2010). Complete Anaerobic Mineralization of Pentachlorophenol (PCP) Under Continuous Flow Conditions by Sequential Combination of PCP-Dechlorinating and Phenol-Degrading Consortia *Biotechnology and Bioengineering* 107: 775, 785.
14. Majumder P.S., Gupta S.K. (2007). Removal of chlorophenols in sequential anaerobic-aerobic reactors, *Bioresour. Technol.* 98(1):118,129
15. Martinez-Hernandez Sergio, Olguin Eugenia, Gómez Jorge, Cuervo-López. (2009). Acetate enhances the specific consumption rate of toluene under denitrifying conditions. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 57:679-687.
16. McGinnis S., Madden T.L. (2004). BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. *Nucleic acids research*. 32: 20,25.
17. Nelson K.E., Weinel C., Paulsen I.T., Dodson R.J., Hilbert H., Martins dos Santos V.A., Fouts D.E., Gill S.R., Pop M., Holmes M., Brinkac L., Beanan M., DeBoy R.T., Daugherty S., Kolonay J., Madupu R., Nelson W., White O., Peterson J., Khouri H., Hance I., Chris Lee P., Holtzapple E., Scanlan D., Tran K., Moazzez A., Utterback T., Rizzo M., Lee K., Kosack D., Moestl D., Wedler H., Lauber J., Stjepandic D., Hoheisel J., Straetz M., Heim S., Kiewitz C., Eisen J.A., Timmis K.N., Dusterhöft A., Tümmler B., Fraser C.M (2002). Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbiol.* 4(12):799, 808.
18. Nübel U., Engelen B., Felske A., Snaidr J., Wieshuber A., Amann R.I., Ludwig W. Backhaus H. (1996). Sequence heterogeneities of genes encoding 16 rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *Journal of bacteriology*. 178:5636, 5643.

19. Phillips T.M., Seech A.G. , Lee H., Trevors J.T. (2001). Colorimetric assay for Lindane dechlorination by bacteria. *Journal of Microbiological Methods* 47:181, 188.
20. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (1998). 20th edn, American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington DC, USA.
21. Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. (2007). MEGA 4, Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software version 4.0. *Molecular biology and evolution*. 24: 1595-1599.
22. Wang C.C., Lee C.M., Kuan C.H. (2000). Removal of 2,4-dichlorophenol by suspended and immobilized *Bacillus insolitus*. *Chemosphere* 41:447,452.
23. Yee Lachlan H., Aagaard V., Johnstone A., Lee M., Kjelleberg Staffan J., Manefield M. (2010). Development of a treatment solution for reductive dechlorination of hexachloro-1,3-butadiene in vadosezone soil. *Biodegradation*. 21:947,956.

## 7. CONCLUSIONES GENERALES Y RECOMENDACIONES

### 7.1 Conclusiones generales

En los cultivos en lote se evidenció la importancia de tener un periodo de contacto previo al compuesto para mejorar las velocidades de consumo de 2CP. Además, se encontró que la adición de un donador externo de electrones puede mejorar la velocidad específica de consumo del 2CP en cultivos en lote. La adición de pequeñas concentraciones de oxígeno no favoreció el consumo del 2CP, en contraste provocó la acumulación de intermediarios.

Las principales conclusiones obtenidas en los ensayos con los dos reactores anaerobios de lote secuenciado (ASBR<sub>A</sub> y ASBR<sub>B</sub>) fueron las siguientes:

Los reactores ASBR fueron capaces de operar favorablemente hasta una concentración de 140 mg C-2CP/L y 140 mg C-fenol/L bajo las condiciones de experimentación descritas. No fue necesaria la presencia de un donador de electrones para la mineralización del 2CP, ya que en presencia o ausencia del donador de e<sup>-</sup> los perfiles de consumo del 2CP y las variables de respuesta del proceso respiratorio presentaron un comportamiento similar.

Se presentó la disminución del 35% y 72% en la velocidad específica de consumo al evaluar la concentración de 140 y 196 mg C-2CP/L respectivamente. Además, en estas dos últimas concentraciones se observó la disminución en la capacidad de sedimentación en el reactor ASBR<sub>B</sub>, reflejado en el incremento de los valores del IVL y PE.

Durante todas las concentraciones fenólicas evaluadas se obtuvieron eficiencias de consumo de 2CP ( $E_{2CP}$ ) mayores o iguales que 90%, asimismo permanecieron bandas relacionadas con *P. putida* y *P. mendocina*, sin tener diferencias entre el reactor ASBR<sub>A</sub> y ASBR<sub>B</sub>. Es posible que la presencia y permanencia de estas bandas se relacione con la deshalogenación observada en ambos reactores.

A la concentración de 196 mg C-2CP/L se observó en ambos reactores la acumulación de fenol y AGV, así como la ausencia de bandas relacionadas con *Caulobacter* y *Bacillus*,

bacterias reportadas como consumidoras de intermediarios del 2CP (fenol, 3-clorobenzoato y benzoato) y como bacterias hidrolíticas-acidogénicas respectivamente.

En ambos reactores los rendimientos de producción de biogás permanecieron constantes de 28 a 140 mg C-2CP/L (promedio  $Y_{C\text{-biogas}/C\text{-2CP}} = 0.8 \pm 0.06$ ). Sin embargo, a 196 mg C-2CP/L se observó una disminución del 78 % en  $Y_{C\text{-biogas}/C\text{-2CP}}$ . A esta última concentración se presentó la desaparición de poblaciones metanogénicas acetoclásticas como *Methanosaeta concilli* e hidrogenotrófas como *Methanobacterium beijingense* y *Uncultured methanobacteriales*. En contraste, *Methanosarcina barkeri*, permaneció en todas las concentraciones evaluadas. De acuerdo a los resultados obtenidos, la disminución en los rendimientos de producción de biogás podría estar relacionada con: i) la ausencia de bacterias acetogénicas-fermentativas, ii) la ausencia de sustratos necesarios para llevar a cabo la metanogénesis y iii) la disminución de las poblaciones metanogénicas reflejados en el decremento de los índices de S y J.

La velocidad específica de consumo de 2CP ( $q_{2CP}$ ) se incrementó 5 veces al aumentar las concentraciones de 42 a 112 mg C-2CP/L, este incremento podría estar relacionado con la aparición de bandas relacionadas con *U. Caulobacter*, *R. lindaniclasticus* y *Uncultured Chloroflexi bacterium*, las cuales han sido asociadas con el consumo de compuestos aromáticos halogenados o productos de su metabolismo. Sin embargo, se observó un decremento en la  $q_{2CP}$  al utilizar concentraciones de 140 a 196 mg C-2CP/L, esta disminución puede estar relacionada: i) con el decremento en la riqueza de las especies (índice S) relacionadas con el consumo de fenol y ii) con una inhibición causada por las concentraciones de compuestos fenólicos evaluadas.

Las altas eficiencias de consumo (90%), en todas las concentraciones evaluadas puede estar relacionado con el equilibrio en las poblaciones microbianas (índice  $J=0.97 \pm 0.2$ ) presentes en ambos reactores.

Con lo mencionado anteriormente se da evidencia de que las asociaciones sintróficas son necesarias para llevar a cabo una adecuada mineralización del 2CP.

## 7.2 Recomendaciones

A partir de los resultados obtenidos en esta tesis se recomienda:

- En el caso particular del 2CP, bajo las condiciones experimentales descritas no es recomendable adicionar pequeñas concentraciones de oxígeno ya que de acuerdo a los resultados se sugiere una posible acumulación de carbono.
- La utilización de un reactor ASBR es una herramienta atractiva para el tratamiento de compuestos aromáticos debido a que el tiempo de aclimatación de los lodos es menor en comparación con otro tipo de sistemas.
- Para la operación favorable de un reactor ASBR se sugiere trabajar con las condiciones experimentales descritas.
- Las herramientas de biología molecular pueden ayudar a entender la fisiología de los procesos microbianos.

## 8. ANEXOS

En la tabla 8.1 se presentan algunos de los coeficientes de correlación obtenidos durante el cálculo de la velocidad específica de consumo de 2CP mediante el método reportado por Elmen et al. (1997).

**Tabla 8.1** Coeficientes de correlación obtenidos del cálculo de las velocidades específicas de consumo derivadas del método de Elmen et al. (1997).

<b>Cinética</b>	<b>Coefficiente de correlación</b>	<b>Figura</b>
Lote/2CP sin acetato	0.978	1 A (Capítulo 4)
Lote/2CP con acetato	0.987	1 A (Capítulo 4)
Lote/2CP con fenol	0.968	1 A (Capítulo 4)
ASBR <sub>A</sub> /(ciclo 16)	0.985	1 A (Capítulo 5)
ASBR <sub>B</sub> /(ciclo 16)	0.977	1 B (Capítulo 5)
ASBR <sub>A</sub> /(ciclo 28)	0.995	1 C (Capítulo 5)
ASBR <sub>B</sub> /(ciclo 28)	0.989	1 D (Capítulo 5)