

ESTUDIO DEL CRECIMIENTO DE *Clostridium acetobutylicum* Y SU RELACIÓN CON EL TRATAMIENTO ANAERÓBICO DE LAS AGUAS RESIDUALES

Altamira Díaz Montiel, Nancy Rincón Lizardo,
Elisabeth Behling Quintero, Edixon Gutiérrez González,
Julio Marín Leal, Elsa Chacín Ramos
y Nola Fernández Acosta*

Departamento de Ingeniería Sanitaria y Ambiental, Escuela de Ingeniería Civil,
Facultad de Ingeniería, La Universidad del Zulia, Apartado Postal 526.
Maracaibo 4001-A, Estado Zulia, Venezuela.

*E-mail: nfernan@luz.ve

Resumen. Se desarrollaron curvas de crecimiento bacteriano por triplicado para determinar las condiciones óptimas para el crecimiento de la bacteria *Clostridium acetobutylicum*, de la Colección Americana ATTC 824. Las curvas fueron realizadas tanto de inóculos esporulados como de inóculos activos. Durante la experimentación se utilizaron diferentes cantidades de inóculo inicial (0,1 y 1 mL) para así determinar el impacto que ejercía sobre la curva de crecimiento. Se pudo observar que la cantidad inicial del inóculo tiene una marcada importancia en el comportamiento de las diferentes etapas de la curva de crecimiento, lo cual pudiera influir sobre el tratamiento anaerobio de las aguas residuales. *Recibido:* 15 Septiembre 1999, *aceptado:* 5 Noviembre 2001.

Palabras clave: aguas residuales, bioquímica del tratamiento, *Clostridium acetobutylicum*, inóculo, tratamiento anaeróbico.

GROWTH STUDY OF THE *Clostridium acetobutylicum* AND ITS RELATIONS WITH THE WASTEWATER ANAEROBIC TREATMENT

Abstract. Growth curves were developed by triplicate was developed for the determination of optimum conditions for the bacterium *Clostridium acetobutylicum*, from the American Culture Collection ATCC 824. The curves were made from esporulates and actives inocules. During the experimentation different inocules quantities were used (0.1 and 1 mL) to determine the impact due to the change in inocule initial amounts. It was showed that the difference in initial inocule amounts has a strong importance on the growth curve, which can be important for the anaerobic treatment of wastewater. *Received:* 15 September 1999, *accepted:* 5 November 2001.

Key words: anaerobic treatment, *Clostridium acetobutylicum*, inocule, treatment anaerobic, treatment biochemical, wastewater treatment.

INTRODUCCIÓN

En la microbiología del tratamiento anaeróbico de las aguas residuales, las características y propiedades del inóculo inicial son determinantes para el óptimo funcionamiento del sistema. El inóculo es la fuente inicial de bacterias, si bien el lodo crudo puede ser usado como inóculo, la lenta velocidad de crecimiento de algunos microorganismos hace necesario añadir un inóculo proveniente de un digestor ya existente (Fernández, Comunicación personal 1993).

Por otra parte, uno de los principales problemas en el tratamiento anaerobio de las aguas residuales es el de mantener bajas concentraciones de hidrógeno dentro de los reactores. Muchos de los microorganismos que intervienen en el tratamiento son capaces de producir grandes cantidades de hidrógeno en sus procesos de degradación de la materia orgánica (Guwy *et al.* 1997, Lay 1999). Estos desbalances en la producción de hidrógeno causan cambios drásticos en las concentraciones de los diferentes tipos de ácidos grasos que sirven como precursores en la formación del gas metano, el cual es el pro-

ducto final del tratamiento anaerobio de las aguas residuales, junto a otros como el dióxido de carbono y el agua (Bhattacharya *et al.* 1995, Boone *et al.* 1989, Soubes 1994). La generación de hidrógeno dentro de los reactores anaeróbicos es atribuido a ciertos grupos de microorganismos, entre ellos los del género *Clostridium*. Estas bacterias son reconocidas como microorganismos productores de altas concentraciones de hidrógeno durante el metabolismo del sustrato; entre ellas, *Clostridium acetobutylicum* es una de las especies anaerobias de mayor producción de hidrógeno (Ford y Mitchell 1989).

De esta manera, resulta importante definir algunas de las características de crecimiento de *Clostridium acetobutylicum* considerando sus propiedades fisiológicas, con la finalidad de establecer su papel al ser utilizado en el inóculo inicial de un sistema de tratamiento anaeróbico de aguas residuales.

En esta investigación se determinó la influencia de la cantidad y condiciones (activo y esporulado) del inóculo inicial sobre el crecimiento óptimo de la bacteria *C. acetobutylicum* presente en las aguas residuales, la cual es responsable del aumento de las presiones parciales de hidrógeno en reactores anaeróbicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

IDENTIFICACIÓN DE LA CEPA BACTERIANA *Clostridium acetobutylicum*

Se practicaron pruebas de Tinción de Gram (APHA, AWWA, WPCF 1992) para confirmar las características morfológicas de la cepa de *C. acetobutylicum* ATCC 824, debido a que se obtuvo del Laboratorio de Salud Pública de la Universidad de Birmingham, Inglaterra. Durante la identificación se realizó la inoculación en cápsulas petri con agar nutritivo PYG (peptona-extracto de levadura-glucosa), bajo condiciones de anaerobiosis a 37°C por 24 h.

ACTIVACIÓN DE LA CEPA BACTERIANA

Para la activación de la cepa bacteriana se inoculó 1,0 mL de la cepa adquirida y preservada en refrigeración (esporulada), en un vo-

lumen de 9,0 mL de medio de cultivo PYG (peptona-extracto de levadura-glucosa) en condiciones de anaerobiosis a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. La incubación se realizó en una jarra Gaspak en una atmósfera de hidrógeno y dióxido de carbono ($\text{H}_2\text{-CO}_2$), utilizando una solución de azul de metileno- NaHCO_3 -glucosa como indicador de anaerobiosis.

CURVA DE CRECIMIENTO POBLACIONAL

Empleando pruebas de temperatura, pH, ausencia de oxígeno y presencia de inhibidores, se obtuvieron las condiciones óptimas para el crecimiento de *C. acetobutylicum*. Posteriormente, se realizaron tres curvas de crecimiento bacteriano por triplicado (Tabla 1). La primera curva de crecimiento (curva A) se realizó utilizando un inóculo esporulado de 1,0 mL de la cepa en 9,0 mL de medio nutritivo (PYG) de la cual se obtuvo la densidad óptica (DO) a intervalos de 1 h durante 24 h. La segunda curva de crecimiento (curva B) se obtuvo utilizando un inóculo previamente activado por 18-24 h de 1,0 mL de la cepa, repitiendo las mediciones de DO cada hora. Para la tercera curva de crecimiento (curva C) se inoculó 0,1 mL de la cepa activada, manteniendo constante el volumen del medio.

Las lecturas de DO fueron realizadas en un espectrofotómetro MILTON ROY Spectronic 20D, a una longitud de onda de 600 nm.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IDENTIFICACIÓN DE LA CEPA BACTERIANA

Se confirmó la presencia de la bacteria *C. acetobutylicum*, mostrando una tinción de Gram Positiva, colonias redondas con bordes

Tabla 1. Condiciones para las curvas de crecimiento de *Clostridium acetobutylicum*.

Curva Tipo	Tipo de Inóculo	Volumen de Inóculo (mL)
A	Esporulado	1,0
B	Activo	1,0
C	Activo	0,1

irregulares y agrietamiento del agar por producción de gases. Los resultados no fueron reproducibles debido a la excesiva producción de gas lo cual modificó la superficie del agar, impidiendo determinar la densidad bacteriana por conteo en placas.

Un problema para quienes trabajan bajo condiciones anaeróbicas es la definición exacta de los microorganismos anaeróbicos estrictos. Mientras esto puede verse como una tarea fácil, se deben realizar un considerable número de pruebas para establecer una sensata y funcional definición del microorganismo en cuestión (Levett 1990).

CURVA DE CRECIMIENTO POBLACIONAL CON INÓCULO ESPORULADO

La Figura 1 muestra el comportamiento de *C. acetobutylicum* partiendo de un inóculo esporulado. Se observa la reproducibilidad de los resultados donde la fase de retardo se prolongó por un periodo aproximado de 8-10 h, durante las cuales no se incrementó significativamente el número de bacterias individuales, teniéndose solamente aumento de su tamaño celular. En esta etapa los valores de DO medidos se mantuvieron casi constantes. Estos resultados coinciden con los de Ford y Mitchell (1989) donde la fase de retardo fue de aproximadamente 6 a 10 h, corroborándose así la extensión de esta fase.

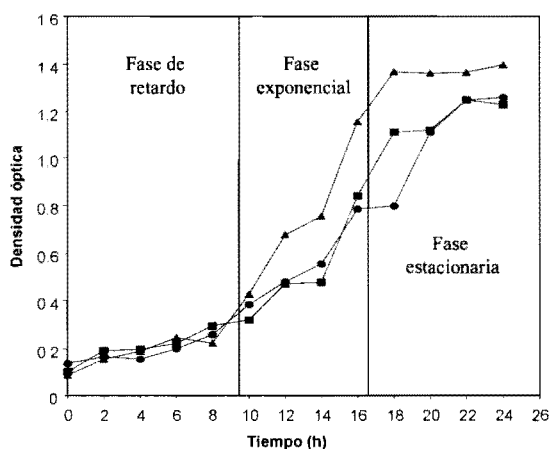


FIGURA 1. Curvas de crecimiento para *Clostridium acetobutylicum* utilizando 1,0 mL de inóculo esporulado.

La fase de multiplicación exponencial se prolongó por aproximadamente 6-8 h, obteniéndose grandes incrementos de la DO, coincidiendo con un aumento de la turbidez en la muestra y un cambio de coloración en la misma, evidenciando una etapa de división celular y aumento logarítmico del número de bacterias.

La velocidad de crecimiento exponencial varió con el tipo de microorganismo y con las condiciones de crecimiento (temperatura, pH, medio de cultivo, etc.). Las células en la fase de crecimiento exponencial son más sensitivas a agentes físicos y químicos que aquellos en la fase estacionaria.

Seguidamente se observó que la población microbiana alcanzó una fase de crecimiento estacionario debido a que no se aprecia aumento significativo de la DO, principalmente debido al agotamiento de los nutrientes (cultivo por carga) y la producción de metabolitos tóxicos; no existe entonces crecimiento neto de la población, el crecimiento celular es balanceado por muerte o lisis celular (Bitton 1994). Esta fase se desarrolla a muy lenta velocidad y se prolonga aproximadamente por 4 h, comenzando desde ese momento una disminución de los valores de DO, aunque ésta se produce muy lentamente y las lecturas permanecen casi constantes hasta el final de las 24 h de medición.

Durante la fase de muerte, el número de microorganismos viables decrece significativamente, sin embargo, la DO permanece constante ya que este método de cuantificación del crecimiento bacteriano no hace distinción entre células vivas y muertas. Aunque, la turbidez de un cultivo también puede decrecer con la lisis celular (Bitton 1994).

CURVA DE CRECIMIENTO POBLACIONAL CON INÓCULO ACTIVO DE 1,0 mL

La Figura 2 muestra las curvas de crecimiento obtenidas inoculando 1,0 mL del cultivo de *C. acetobutylicum* en 9,0 mL de medio de cultivo PYG. En las mismas se observa el inicio de la fase de crecimiento exponencial casi 2 h después de la inoculación, debido a

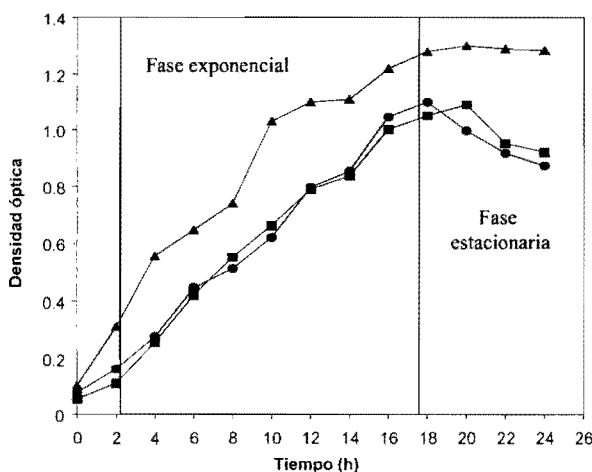


FIGURA 2. Curvas de crecimiento para *Clostridium acetobutylicum* utilizando 1,0 mL de inóculo activo.

que la cepa activa logra adaptarse más rápidamente, reduciendo la fase de retardo. La duración de esta fase depende de las condiciones a las que estuvo sometida anteriormente la célula (edad, exposiciones a agentes físicos, químicos, medio de cultivo, etc.). Bitton (1994) observó una fase de no retardo cuando un cultivo en la fase de crecimiento exponencial fue transferido en condiciones similares a un medio de crecimiento similar al empleado en este trabajo.

La duración de su fase de crecimiento logarítmico se extiende aproximadamente por 18-20 h entrando luego a una fase de crecimiento estacionario y esporulación que puede exceder las 26 h después de la inoculación.

CURVA DE CRECIMIENTO POBLACIONAL CON INÓCULO ACTIVO DE 0,1 mL

En la Figura 3 se muestran los resultados obtenidos de las Curvas de Crecimiento con un inóculo de 0,1 mL en 9,0 mL de medio PYG, donde se puede observar una fase de retardo que se prolonga aproximadamente por 4 h logrando luego alcanzar una fase de crecimiento exponencial que se extendió aproximadamente por 6 h y comienza a mantenerse constante por un tiempo mayor a 4 h.

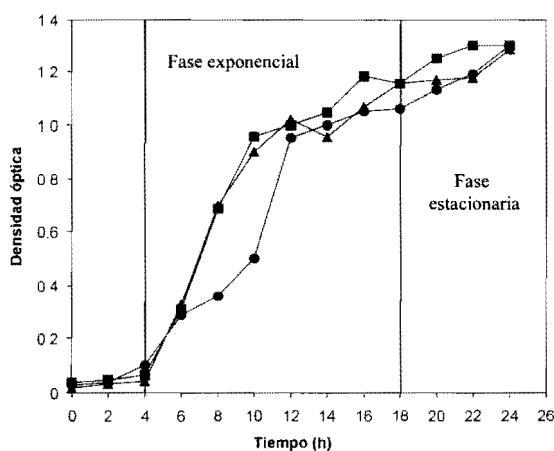


FIGURA 3. Curvas de crecimiento para *Clostridium acetobutylicum* utilizando 0,1 mL de inóculo activo.

Ford y Mitchell (1989) reportaron una curva de crecimiento para *C. acetobutylicum* en la cual la fase de retardo coincide con los resultados obtenidos en este trabajo, con una duración de 6-10 h; por otra parte, obtuvieron una fase de crecimiento exponencial de una duración aproximada de 3 h. La duración de la fase exponencial obtenida en esta investigación se extendió por aproximadamente 6-8 h, duplicando el tiempo de duración presentado por los referidos investigadores. Sin embargo, debido a que las condiciones específicas de temperatura, volumen de inóculo, tiempo de activación del mismo, etc., no fueron descritas con exactitud en el referido trabajo, no es posible establecer las causas de esta diferencia.

La velocidad de crecimiento bacteriano no depende sólo de la concentración del sustrato y los productos del medio donde crecen, sino también, del volumen inicial del inóculo (Bitton 1994, Soubes 1994), lo cual como se ha evidenciado en esta investigación retarda o acelera la aparición de las diferentes etapas del crecimiento bacteriano, este conocimiento puede ser usado cuando se desea manipular el crecimiento de *C. acetobutylicum* en un sistema de tratamiento de aguas por medios anaerobios.

La población microbiana puede crecer en cultivos por carga (sistema cerrado) o en cultivos continuos (sistemas abiertos). Para

cultivos por carga pueden obtenerse bien definidas las fases descritas en las curvas de crecimiento presentadas, las cuales son típicas de cada microorganismo expuesto a las condiciones específicas de crecimiento. En cultivos con flujo continuo se pueden mantener el cultivo microbiano en la fase de crecimiento exponencial por largos periodos de tiempo, en los cuales la multiplicación de las células se realiza en un reactor con volumen constante. En estos casos la fase estacionaria no es alcanzada por el cultivo, prolongándose el crecimiento sin agotamiento de nutrientes, es por ello que controlar el crecimiento de cualquier microorganismo en los sistemas de tratamiento de aguas residuales es un poco complejo, pero una vez reconocida la velocidad y condiciones de crecimiento, el cultivo puede ser algo menos complejo.

Como puede observarse en la Figura 4, los tiempos de duración de las fases de retardo, exponencial e incluso de crecimiento estacionario difieren en los tres tipos de condiciones estudiadas, esto debido a que el tiempo empleado para el crecimiento celular y la velocidad de crecimiento no sólo dependen de las condiciones externas de crecimiento sino también de la relación biomasa/sustrato, activación y esporulación, lo cual indica que al manipular esta relación, se pueden disminuir ciertos tipos de microorganismos junto con el crecimiento

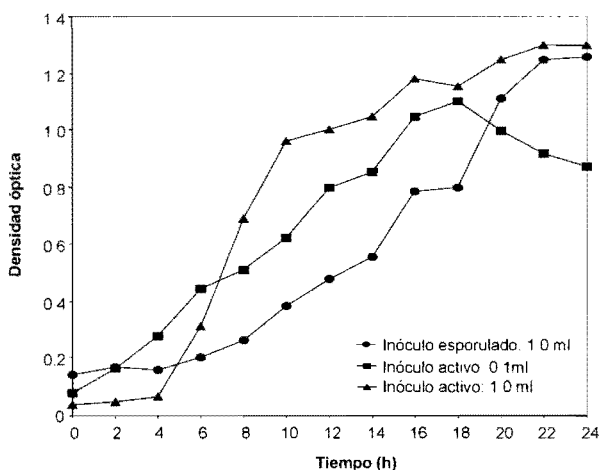


FIGURA 4. Curvas de crecimiento para *Clostridium acetobutylicum* utilizando inóculo esporulado y activo.

del ambiente físico-químico requerido para activar o desactivar el crecimiento.

Finalmente, el conocimiento específico de la duración y comportamiento de cada fase del crecimiento bacteriano nos permite un mayor control de cualquier proceso, en el cual estos microorganismos estén involucrados, debido a la factibilidad de controlar, aislar, inhibir o acelerar su actividad metabólica, crecimiento y reproducción, de allí la importancia de este estudio para mejorar el tratamiento biológico de las aguas residuales.

CONCLUSIONES

Las curvas de crecimiento de *C. acetobutylicum* con inóculo esporulado mostraron retardo para inicial la fase de crecimiento exponencial, lo cual evidencia la dificultad inicial del cultivo microbiano de adaptarse a las nuevas condiciones ambientales, lo cual debe ser considerado para realizar el arranque de un reactor anaeróbico para el tratamiento de aguas residuales.

Las curvas de crecimiento realizadas muestran que existen diferencias significativas entre la fase de retardo de una curva con inóculo activo de 1,0 y 0,1 mL, por lo cual es importante establecer límites en el volumen inicial de inóculo en un reactor anaeróbico por carga, debido a que esto va a influir sobre la eficiencia del mismo.

Existen diferencias significativas en el comportamiento de la fase de crecimiento exponencial de las curvas con inóculo esporulado e inóculo activo. Esta fase tiene gran importancia dentro del tratamiento de las aguas residuales ya que afecta la eficiencia de los sistemas.

El comportamiento de la fase estacionaria fue muy semejante en las tres condiciones de cultivo estudiadas (inóculos esporulado: 1,0 mL, activo: 1,0 mL y activo: 0,1 mL).

LITERATURA CITADA

- APHA, AWWA, WEF. 1992. Standard Methods for the examination of water and wastewater. 18th edition. USA.
- BHATTACHARYA, S., SLUDER, J. and V. UBEROI. 1995. Effects of 4-nitrophenol on H₂ and CO levels in anaerobic propionate systems. *Wat. Res.* 29(5): 1249-1258.
- BITTON, G. 1994. Water microbiology. John Wiley & Sons Ltd. Chapter 2. Microbial metabolism and growth, pp. 31-49.
- BOONE, D., R. JOHNSON and Y. LIU. 1989. Diffusion of the interspecies electron carrier H₂ and formate in methanogenic ecosystems and implications in the measurement of K_m for H₂ and formate uptake. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1735-1741.
- FORD, T. and R. MITCHELL. 1989. Hydrogen embitterment: A microbiological perspective. *Corrosion*, 189: 1-9.
- GUWY, A., F. HAWKES, D. HAWKES and A. ROZZI. 1997. Hydrogen production in a high rate fluidized bed anaerobic digester. *Wat. Res.* 31(6): 1291-1298.
- LAY, J., Y. LEE and T. NOIKE. 1999. Feasibility of biological hydrogen production from organic fraction of municipal solid waste. *Wat. Res.* 33(11): 2579-2586.
- LEVETT, P. 1990. Anaerobic bacteria a functional biology. Open University Press. Milton Keynes. Philadelphia, 102 pp.
- SOUBES, M. 1994. Microbiología de la digestión anaerobia. II Taller y Seminario Latinoamericano: Tratamiento anaerobio de aguas residuales. Montevideo, Uruguay, pp. 15-27.