

## Enfoques Interdisciplinarios para la Sustentabilidad del Ambiente Producción y Ambiente Efluentes líquidos

### Estabilidad de la degradación aerobia de Bisfenol A y sus principales productos metabólicos por barros activados

#### On the stability of the aerobic degradation of Bisphenol A and its metabolic products by activated sludge

Ferro Orozco A.M.<sup>a</sup>, Contreras E.M.<sup>a</sup>, Zaritzky N.E.<sup>bcd</sup>

<sup>a</sup>Instituto de Investigaciones en Ciencia y Tecnología de Materiales (INTEMA). Fac. de Ing., UNMdP.

<sup>b</sup>Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA). <sup>c</sup>Fac. de Cs. Exactas, UNLP. <sup>d</sup>Fac. de Ingeniería, UNLP. e-mail: [edgardo.contreras@fi.mdp.edu.ar](mailto:edgardo.contreras@fi.mdp.edu.ar)

#### Resumen

Aunque el bisfenol A (BFA) ha sido descripto como un compuesto estrogénico, en la actualidad es utilizado industrialmente en la producción de policarbonatos, resinas epoxi y otros plásticos. Por esta razón, ha sido detectado en aguas residuales (AR) industriales y municipales. Una de las metodologías propuestas para lograr la descontaminación de AR conteniendo BFA es la utilización de cultivos microbianos mixtos como los barros activados (BA). Diversos estudios sobre la biodegradación de BFA han demostrado la presencia de 4-hidroxiacetofenona (4HAF), 4-hidroxibenzaldehído (4HB) y ácido 4-hidroxibenzoico (A4HB) como sus principales intermediarios metabólicos. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la estabilidad de la degradación de BPA, 4HAF, 4HB, y A4HB empleando barros activados. La biodegradación de los compuestos fue estudiada empleando un respirómetro abierto. En todos los ensayos se utilizaron barros aclimatados previamente al BFA. Se realizaron 30 adiciones de S (un pulso de 20 mg L<sup>-1</sup> por día) para todos los compuestos analizados. La estabilidad de la degradación de cada S fue evaluada en términos de la velocidad específica media de consumo de sustrato ( $q_s$ ,  $\mu\text{molS gSST}^{-1} \text{h}^{-1}$ ). Por otra parte, se analizó la estequiometría de las reacciones de oxidación de cada sustrato mediante la obtención del coeficiente de oxidación ( $Y_{O/S}$ ,  $\text{molO}_2 \text{ molS}^{-1}$ ) en cada caso. Los valores de  $q_s$  correspondientes al BFA se mantuvieron constantes durante el ensayo completo, siendo el valor medio de  $9,91 \pm 2,71 \mu\text{molBPA gSST}^{-1} \text{h}^{-1}$ . En el caso de los demás compuestos en estudio se observó un incremento gradual de los valores de  $q_s$  a medida que progresaba el ensayo. Para la 4HAF se observaron dos etapas, el valor medio de  $q_s$  fue de  $5,42 \pm 0,70$  y  $11,08 \pm 1,74 \mu\text{mol4HAF gSST}^{-1} \text{h}^{-1}$ , para las etapas 1 y 2 respectivamente. En el caso del 4HB, la etapa 1 mostró un incremento gradual de los valores de  $q_s$  desde 43 hasta  $183 \mu\text{mol4HB gSST}^{-1} \text{h}^{-1}$ . Durante la etapa 2 el valor medio de  $q_s$  fue de  $310,80 \pm 31 \mu\text{mol4HB gSST}^{-1} \text{h}^{-1}$ . El ensayo correspondiente al A4HB mostró 3 etapas. Durante la etapa 1, los valores de  $q_s$  aumentaron desde 35 hasta  $405 \mu\text{molA4HB gSST}^{-1} \text{h}^{-1}$ . Durante la segunda etapa se obtuvo un valor medio de  $q_s$  de  $447,04 \pm 24 \mu\text{molA4HB gSST}^{-1} \text{h}^{-1}$ . En la etapa 3, los valores de  $q_s$  disminuyeron progresivamente hasta estabilizarse en un valor de  $190,70 \pm 5,27 \mu\text{molA4HB gSST}^{-1} \text{h}^{-1}$ . Si bien la actividad de biodegradación presentó cambios durante los ensayos, la estequiometría de todas las reacciones de degradación se mantuvo constante con las adiciones sucesivas de sustrato. Los valores medios de  $Y_{O/S}$  obtenidos fueron de  $9,16 \pm 1,55$ ,  $5,76 \pm 0,97$ ,  $3,26 \pm 0,36$ , y  $2,53 \pm 0,32 \text{ molO}_2 \text{ molS}^{-1}$  para BFA, 4HAF, 4HB y A4HB, respectivamente. Considerando las rutas metabólicas propuestas en literatura, los valores de  $Y_{O/S}$  correspondientes a la oxidación completa de los compuestos y los

valores de  $Y_{O/S}$  obtenidos experimentalmente, los resultados sugieren que en la oxidación de los compuestos estudiados intervienen principalmente oxigenasas, dando como resultado productos que no presentan toxicidad.

**Palabras clave:** barros activados, bisfenol A, degradación, estabilidad.

## Introducción

Como resultado de su gran utilización en la producción de policarbonato y resinas epoxi el Bisfenol A (BFA) es detectado frecuentemente en aguas residuales.<sup>1</sup> Sin embargo, el BFA presenta efectos adversos sobre la salud debido a que se comporta como un disruptor endócrino.<sup>2</sup> Existe una gran cantidad de información que indica que la exposición humana al BFA está asociada con el incremento del riesgo de enfermedades cardiovasculares, abortos espontáneos, disminución del peso del bebé en nacimientos a término, cáncer de mama y próstata, disfunciones reproductivas y sexuales, alteración del sistema inmune, problemas metabólicos, diabetes en adultos, problemas en el desarrollo cognitivo en niños.<sup>3-5</sup>

La utilización microorganismos para mineralizar contaminantes representa una alternativa más segura y económica que los procesos físico-químicos.<sup>2</sup> El metabolismo microbiano ha sido descrito como una tecnología con gran potencial para la detoxificación de aguas residuales conteniendo BFA.<sup>6,7</sup> Se han descrito diferentes rutas metabólicas, las cuales generan diversos productos metabólicos.<sup>8</sup> En general, los productos metabólicos más frecuentemente detectados son la 4-hidroxiacetofenona (4HAF), el 4-hidroxibenzaldehído (4HB), y el ácido 4-hidroxibenzoico (A4HB).<sup>6,9,10</sup> En este sentido, para evaluar el impacto de la descarga de BFA en el ambiente, debe considerarse tanto la biodegradabilidad de dicho compuesto como también la de sus productos de degradación. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la estabilidad de la degradación de BPA, 4HAF, 4HB, y A4HB empleando barros activados. Por otra parte, se analizó la estequiometría de las reacciones de oxidación de cada compuesto en estudio.

## Materiales y Métodos

**Barros activados.** Los barros activados fueron obtenidos de una planta de tratamiento de efluentes a escala laboratorio (4.5 L). La planta fue alimentada con un medio de cultivo sintético compuesto por 1500 mg de suero de queso deshidratado, 94 mg de  $SO_4(NH_4)_2$  y 1030 mg de  $NaHCO_3$  disuelto en un litro de agua. Las condiciones de operación de la planta fueron las siguientes: temperatura =  $20 \pm 2$  °C, tiempo de residencia hidráulico = 2 días, tiempo de residencia celular = 45 días. El oxígeno fue suministrado mediante burbujeadores los cuales también proveían agitación. La concentración de oxígeno disuelto (OD) fue mayor a  $4 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$ . En estado estacionario el pH de la planta fue de  $7.0 \pm 0.5$ .

**Aclimatación de los barros activados al bisfenol A.** Previamente a su utilización en los ensayos de biodegradación, la biomasa obtenida de la planta de tratamiento descrita en la sección anterior fue aclimatada al BFA como única fuente de carbono y energía. Los barros activados fueron centrifugados y resuspendidos en buffer fosfato ( $KH_2PO_4$  2 g  $L^{-1}$ ;  $K_2HPO_4$  0.5 g  $L^{-1}$ , pH = 7). Se adicionaron además BFA ( $40 \text{ mg L}^{-1}$ ) y las soluciones de micronutrientes M1 y M2 ( $1 \text{ ml L}^{-1}$ ). La composición de la solución M1 fue (g/100ml):  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  1.5,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5,  $MnSO_4 \cdot H_2O$  0.3,  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  0.075,  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$  0.015, y ácido cítrico 0.6. La

solución M2 contenía (g/100ml):  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.05,  $\text{BO}_3\text{H}_3$  0.01, KI 0.01. La aclimatación de la biomasa al BFA fue monitoreada mediante la medición de la concentración de BFA en función del tiempo.<sup>11</sup>

**Respirometría.** Los ensayos respirométricos se realizaron en respirómetro abierto compuesto por un reactor cilíndrico (volumen total = 500 mL), control de temperatura ( $25 \pm 2$  °C), un sistema de provisión de aire (bomba y difusor), agitador magnético y un electrodo de oxígeno disuelto (YSI Incorp. Modelo ProODO, Ohio, USA) conectado a una PC. La calibración del respirómetro se realizó mediante un método dinámico. El experimento consistía en colocar en el respirómetro 500 mL de una muestra de barros aclimatados al BFA con una concentración de biomasa conocida ( $2\text{-}2.5$  gSST  $\text{L}^{-1}$ ). Luego se agregaba un pulso de una solución stock del sustrato en estudio (BFA, 4HAF, 4HB, A4HB) para obtener la concentración final deseada ( $20$  mg  $\text{L}^{-1}$ ). En todo momento se monitoreó la concentración de OD ( $C$ ,  $\text{mgO}_2$   $\text{L}^{-1}$ ) en el respirómetro en función del tiempo ( $t$ ). A partir del balance de masa para el OD se calculó la velocidad de respiración total ( $R_T$ ,  $\text{mgO}_2$   $\text{L}^{-1}$   $\text{h}^{-1}$ ) mediante la siguiente expresión:

$$R_T = k_L a (C_s - C) - \frac{dC}{dt} \quad (1)$$

donde  $k_L a$  ( $\text{h}^{-1}$ ) es el coeficiente global de transferencia de oxígeno y  $C_s$  ( $\text{mgO}_2$   $\text{L}^{-1}$ ) la concentración de OD de saturación en las condiciones de operación.

La velocidad de respiración total de los microorganismos ( $R_T$ ) puede ser dividida en una velocidad de respiración endógena ( $R_{En}$ ) y una exógena ( $R_{Ex}$ ). Cuando no hay ningún tipo de sustrato oxidable (S), los microorganismos oxidan su propia biomasa con el objeto de generar energía para las funciones de mantenimiento celular ( $R_{En}$ ). Al agregar un sustrato se observa un aumento de  $R$  asociado a la oxidación del sustrato agregado; en este caso  $R_T = R_{En} + R_{Ex}$ ; cuando se agota S,  $R$  vuelve a un valor cercano al inicial. Así, el oxígeno consumido (OC,  $\text{mgO}_2$   $\text{L}^{-1}$ ) durante la oxidación de S resulta:

$$\text{OC} = \int (R_T - R_{En}) dt = \int R_{Ex} dt \quad (2)$$

A partir de este valor, se calculó el coeficiente de oxidación ( $Y_{O/S}$ ,  $\text{molO}_2$   $\text{molS}^{-1}$ ) como el cociente entre OC y la concentración inicial de sustrato agregado ( $\text{mgS}$   $\text{L}^{-1}$ ). Con el objeto de normalizar los resultados, los valores de las velocidades ( $R$ ) fueron expresados por unidad de biomasa:

$$q_{O_2} = \frac{R_{ex}}{X_0} \quad (3)$$

donde  $q_{O_2}$  ( $\mu\text{molO}_2$   $\text{gSST}^{-1}$   $\text{h}^{-1}$ ) es la velocidad específica de consumo de oxígeno,  $R_{ex}$  es la velocidad de consumo de  $\text{O}_2$  ( $\text{mgO}_2$   $\text{L}^{-1}$   $\text{h}^{-1}$ ), y  $X_0$  corresponde a la concentración de biomasa en el respirómetro.

Debido a que los valores máximos de  $q_{O_2}$  dependen mucho de la forma del perfil respirométrico de cada compuesto en particular, para realizar comparaciones se obtuvo el valor de la velocidad media específica de consumo de sustrato ( $q_{S\text{medio}}$ ,

$\mu\text{mol S gSST}^{-1} \text{h}^{-1}$ ). El valor de  $q_{\text{Smedio}}$  se calculó como la relación entre  $S_0$  y el tiempo total de degradación ( $\Delta t$ ).<sup>12</sup>

**Técnicas analíticas.** La concentración de biomasa fue medida como sólidos suspendidos totales (SST,  $\text{mg L}^{-1}$ ). La concentración de los diferentes sustratos fue determinada como carbono orgánico total (COT,  $\text{mg L}^{-1}$ ). La concentración de BFA durante la aclimatación de los barros activados fue determinada mediante la utilización del método colorimétrico de la 4-aminoantipirina.<sup>13</sup>

## Resultados y discusión

La Figura 1 muestra los perfiles respirométricos correspondientes a la adición de pulsos sucesivos de BFA. Considerando la variabilidad en los valores máximos de  $q_{\text{O}_2}$ , puede observarse que los mismos se mantuvieron prácticamente constantes a lo largo de todo el ensayo. Lo mismo fue observado para los valores de  $q_{\text{Smedio}}$ , obteniéndose un valor promedio de  $9,91 \pm 2,71 \mu\text{molBFA gSST}^{-1} \text{h}^{-1}$ .

Las Figuras 2, 3 y 4 muestran los perfiles respirométricos correspondientes a la adición de pulsos sucesivos de  $20 \text{ mg L}^{-1}$  de 4HAF, 4HB y A4HB, respectivamente. En todos los casos se observó un incremento de los valores de  $q_{\text{O}_2}$  máximo a lo largo del ensayo. El aumento paulatino en la

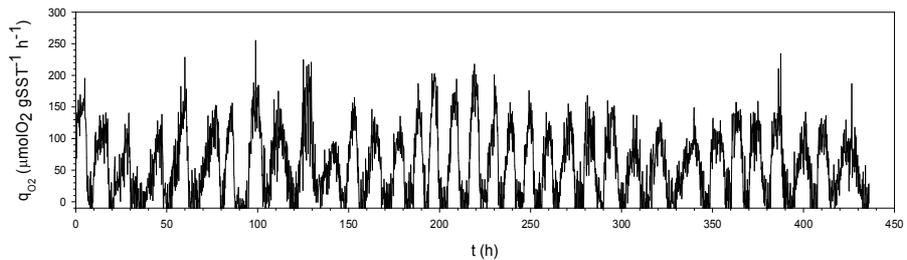


Fig.1. Efecto de la adición de pulsos sucesivos de BFA sobre la velocidad específica de consumo de oxígeno ( $q_{\text{O}_2}$ ) de barros activados. Cada curva respresenta la adición de un pulso de sustrato ( $20 \text{ mg L}^{-1}$ ).

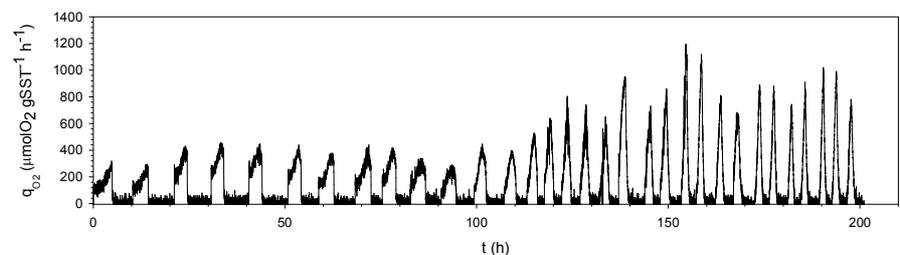


Fig.2. Efecto de la adición de pulsos sucesivos de 4HAF sobre la velocidad específica de consumo de oxígeno ( $q_{\text{O}_2}$ ) de barros activados. Cada curva representa la adición de un pulso de sustrato ( $20 \text{ mg L}^{-1}$ ).

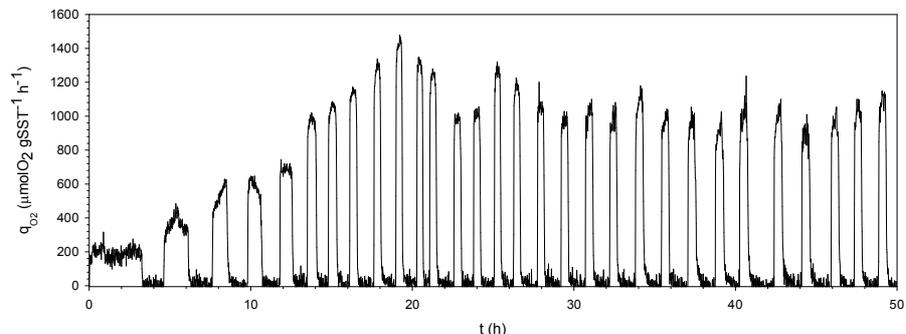


Fig.3. Efecto de la adición de pulsos sucesivos de 4HB sobre la velocidad específica de consumo de oxígeno ( $q_{\text{O}_2}$ ) de barros activados. Cada curva representa la adición de un pulso de sustrato ( $20 \text{ mg L}^{-1}$ ).

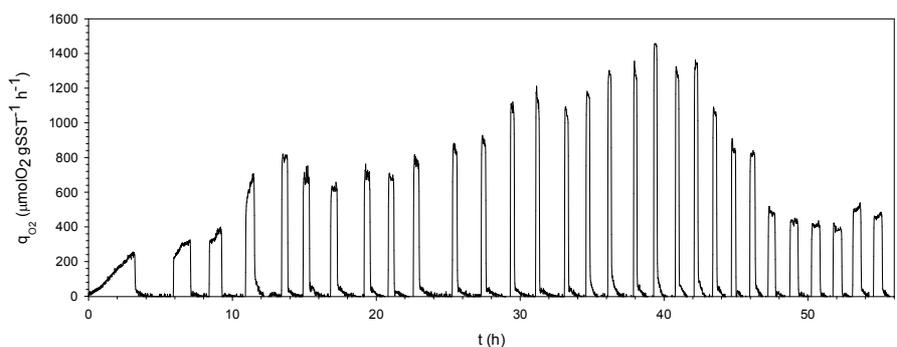


Fig.4. Efecto de la adición de pulsos sucesivos de A4HB sobre la velocidad específica de consumo de oxígeno ( $q_{\text{O}_2}$ ) de barros activados. Cada curva representa la adición de un pulso de sustrato ( $20 \text{ mg L}^{-1}$ ).

velocidad específica de consumo de oxígeno fue atribuido a una segunda etapa de aclimatación de la biomasa a los nuevos sustratos adicionados.

Los microorganismos utilizados en todos los ensayos fueron aclimatados previamente al BFA. Debido a que no se observaron períodos de latencia con la adición de 4HAF, 4HB y A4HB, puede inferirse que el proceso de aclimatación de la biomasa al BFA confiere a las células la capacidad de degradar todos los compuestos en estudio. Sin embargo, el cambio de fuente de carbono y energía, de BFA a cualquiera de los productos metabólicos estudiados, generó un nuevo período de aclimatación con el consiguiente aumento en la actividad metabólica microbiana. Asimismo, las Figuras 2, 3, y 4 muestran que dicha actividad se modificó a medida que progresaban los ensayos y con cada compuesto en estudio, observándose diferentes etapas.

Para realizar comparaciones entre las etapas y entre compuestos, se obtuvo el valor de la velocidad media específica de consumo de sustrato ( $q_{S\text{medio}}$ ,  $\mu\text{molS gSST}^{-1} \text{h}^{-1}$ ). Para la 4HAF se observaron dos etapas, el valor medio de  $q_{S\text{medio}}$  fue de  $5,42 \pm 0,70$  y  $11,08 \pm 1,74 \mu\text{mol4HAF gSST}^{-1} \text{h}^{-1}$ , para las etapas 1 y 2 respectivamente. En el caso del 4HB, la etapa 1 mostró un incremento gradual de los valores de  $q_{S\text{medio}}$  desde 43 hasta  $183 \mu\text{mol4HB gSST}^{-1} \text{h}^{-1}$ . Durante la etapa 2 el valor medio de  $q_{S\text{medio}}$  fue de  $310,80 \pm 31 \mu\text{mol4HB gSST}^{-1} \text{h}^{-1}$ . El ensayo correspondiente al A4HB mostró 3 etapas. Durante la etapa 1, los valores de  $q_{S\text{medio}}$  aumentaron desde 35 hasta  $405 \mu\text{molA4HB gSST}^{-1} \text{h}^{-1}$ . Durante la segunda etapa se obtuvo un valor promedio de  $q_{S\text{medio}}$  de  $447,04 \pm 24 \mu\text{molA4HB gSST}^{-1} \text{h}^{-1}$ . En la etapa 3, los valores de  $q_{S\text{medio}}$  disminuyeron progresivamente hasta estabilizarse en un valor de  $190,70 \pm 5,27 \mu\text{molA4HB gSST}^{-1} \text{h}^{-1}$ . En éste último caso, la tercera etapa indicó una pérdida en la actividad de degradación.

Si bien la actividad de biodegradación presentó cambios durante los ensayos, la estequiometría de todas las reacciones se mantuvo constante con las adiciones sucesivas de sustrato. Los valores medios de  $Y_{O/S}$  obtenidos fueron de  $9,16 \pm 1,55$ ,  $5,76 \pm 0,97$ ,  $3,26 \pm 0,36$ , y  $2,53 \pm 0,32 \text{ molO}_2 \text{ molS}^{-1}$  para BFA, 4HAF, 4HB y A4HB, respectivamente. Considerando las rutas metabólicas propuestas en literatura, los valores de  $Y_{O/S}$  correspondientes a la oxidación completa de los compuestos y los valores de  $Y_{O/S}$  obtenidos experimentalmente, los resultados sugieren que en la oxidación de los compuestos estudiados intervienen principalmente oxigenasas, dando como resultado productos que no presentan toxicidad.

## Conclusiones

La adición de pulsos sucesivos de BFA no provocó cambios en la actividad de degradación del compuesto. Por el contrario, con la adición de 4HAF, 4HB, y A4HB se observaron dos etapas durante las cuales se incrementó la actividad metabólica microbiana. Dicho aumento fue atribuido a un nuevo período de aclimatación provocado por el cambio de fuente de carbono y energía. La adición de A4HB mostró una tercera etapa en la cual se observó pérdida de la actividad de degradación. La estequiometría de todas las reacciones se mantuvo constante con las adiciones sucesivas de sustrato.

## Referencias

1-Melcer H., Klecka G. Treatment of wastewaters containing bisphenol A: state of the science review. *Water Environ Res* 83 (2011) 650-666.

- 2-Omoike A., Wacker T., Navidonski M. Biodegradation of bisphenol A by *Heliscus lugdunensis*, a naturally occurring hyphomycete in freshwater environment. *Chemosphere* 91(2013) 1643-1647.
- 3-Braun, J. M., Yolton, K., Dietrich, K. N., Hornung, R., Ye, X., Calafat, A. M., & Lanphear, B. P. Prenatal bisphenol A exposure and early childhood behavior. *Environ Health Persp*, 117 (2009) 1945–1952.
- 4-Rees Clayton E. M., Todd M., Dowd J. B., Aiello A. E. The impact of bisphenol A and triclosan on immune parameters in the U.S. population, NHANES 2003-2006. *Environ Health Persp*, 119 (2011) 390–396.
- 5-Miao M., Yuan W., Zhu G., He X., Li D-K. In utero exposure to bisphenol-A and its effect on birth weight of offspring. *Reprod Toxicol* 32 (2011) 64–68.
- 6-Zhang C., Zeng G., Yuan L., Yu J., Li J., Huang G., Xi B., Liu H. Aerobic degradation of bisphenol A by *Achromobacter xylosoxidans* strain B-16 isolated from compost leachate of municipal solid waste. *Chemosphere* 68 (2007) 181-190.
- 7-Kabiersch G., Rajasärkkä J., Ullrich R., Tuomela M., Hofrichter M., Virta M., Hatakka A., Steffen K. Fate of bisphenol A during treatment with the litter-decomposing fungi *Stropharia rugosoannulata* and *Stropharia coronilla*. *Chemosphere* 83 (2011) 226-232.
- 8-Gao J., Ellis L.B.M., Wachett L.P. The University of Minnesota Biocatalysis/Biodegradation Database: improving public access. *Nucleic Acids Research* 38 (2010) D488-D491.
- 9-Spivack J., Leib T.K., Lobos J.H. Novel pathway for bacterial metabolism of bisphenol A. Rearrangements and stilbene cleavage in bisphenol A metabolism. *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 7323-7329.
- 10-Sasaki M., Maki J-i., Oshiman K-i., Matsumura Y., Tsuchido T. Biodegradation of bisphenol A by cells and cell lysate from *Sphingomonas* sp. strain AO1. *Biodegrad.* 16 (2005) 449-459.
- 11-Ferro Orozco A.M., Lobo C.C., Contreras E.M., Zaritzky N.E. Biodegradation of bisphenol-A (BPA) in activated sludge batch reactors: Analysis of the acclimation process. *Int Biodeterior Biodegrad* 85 (2013) 392-399.
- 12-Lobo C.C., Bertola N.C., Contreras E.M. Stoichiometry and kinetic of the aerobic oxidation of phenolic compounds by activated sludge. *Bioresour Technol* 136 (2013) 58-65.
- 13-Modaressi K., Taylor K.E., Bewtra J.K., Biswas N. Laccase-catalyzed removal of bisphenol-A from water: Protective effect of PEG on enzyme activity. *Water Research* 39 (2005) 4309-4316.