

26TCAM - CINÉTICA Y ESTEQUIOMETRÍA DE LA DEGRADACIÓN AEROBIA DE BISFENOL A Y SUS PRINCIPALES PRODUCTOS POR BARROS ACTIVADOS

FERRO OROZCO¹ A.M., CONTRERAS¹ E.M., ZARITZKY N.E.^{2,3}

1.Instituto de Investigaciones en Ciencia y Tecnología de Materiales (INTEMA).
Fac. de Ingeniería, UNMdP.

2.Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA).
Fac. de Cs. Exactas, UNLP.

3.Fac. de Ingeniería, UNLP.

e-mail: micaela.ferro@fi.mdp.edu.ar

Resumen

El bisfenol A (BFA) ha sido descripto como un compuesto estrogénico. Sin embargo, es utilizado industrialmente en la producción de policarbonatos, resinas epoxi y otros plásticos. Como resultado de su amplio uso 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 (4HBA) y ácido 4-hidroxibenzoico (A4HB) como los principales intermediarios metabólicos. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la cinética y la estequiometría de la degradación aeróbica de BFA y sus productos empleando barros activados. Se analizó el efecto del tiempo de residencia celular (TRC) y del incremento en la concentración de sustrato ($5-20 \text{ mg L}^{-1}$) sobre los parámetros cinéticos y estequiométricos. La biodegradación de los compuestos fue estudiada empleando un respirómetro abierto. En todos los ensayos se utilizaron barros aclimatados previamente al BFA. El TRC no afectó la cinética de degradación de BFA y 4-HAF. Por el contrario, la cinética de degradación de A-4HB y 4-HB fue mayor para BA₃₀ que para BA₄₅. Los valores de q_{O_2} correspondientes a BFA se mantuvieron aproximadamente constantes durante los tres ciclos sucesivos en los que se incrementó la concentración de BFA. Sin embargo, los valores de q_{O_2} para la 4HAF, 4HBA y A4HB se incrementaron tanto con la concentración de sustrato como en cada uno de los ciclos sucesivos. Estos resultados indicarían un nuevo período de aclimatación de la biomasa ante la presencia de los mencionados compuestos. Los valores correspondientes al coeficiente de oxidación de los sustratos en estudio ($Y_{O/S}$, $\text{molO}_2 \text{ molS}^{-1}$) fueron similares para los diferentes TRC. Además, la concentración inicial del sustrato estudiado tampoco afectó el valor de $Y_{O/S}$. Los valores medios de $Y_{O/S}$ para BFA, 4HAF, 4HBA y A4HB fueron 10.21 ± 0.95 , 5.34 ± 0.41 , 3.79 ± 0.17 y $3.14 \pm 0.30 \text{ molO}_2 \text{ molS}^{-1}$, respectivamente. Considerando la reacción de oxidación total de cada uno de los sustratos y la ruta metabólica para la degradación microbiana aeróbica de BFA propuesta en literatura, los resultados sugieren que la oxidación de todos los sustratos en estudio se produce hasta compuestos que no presentan toxicidad.

1. Introducción

El bisfenol A (BFA) es considerado un compuesto estrogénico. Es utilizado industrialmente en la producción de policarbonatos, resinas epoxi y otros plásticos (Sasaki y col., 2005), como consecuencia, 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 puros o mixtos (Sakai y col., 2007; Zhang y col., 2007; Kabiersch y col., 2011). La biodegradación de BFA generalmente se produce a través de dos rutas metabólicas que conducen a la formación de varios productos de degradación. Durante la ruta menor se produce la acumulación de los productos finales 2,3-bis(4-hidroxifenil)-1,2-propanodiol y p-hidroxifenil alcohol (Spivack y col., 1994). Por otra parte, aun cuando a través de la mayor ruta el BFA puede ser mineralizado completamente, en varios casos ha sido descrita la acumulación de 4-hidroxiacetofenona (4-HAF), 4-hidroxibenzaldehído (4-HB) y ácido 4-hidroxibenzoico (A-4HB) como sus principales productos (Spivack y col., 1994; Sasaki y col., 2005; Sakai y col., 2007; Zhang y col., 2007). Por lo tanto, para evaluar el impacto de la descarga de BFA en el medio ambiente debe considerarse también la biodegradabilidad de sus productos de degradación.

Por esta razón, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la cinética y la estequiometría de la degradación aeróbica de BFA y sus productos empleando barros activados. Con tal motivo se analizará el efecto del tiempo de residencia celular (TRC) y del incremento en la concentración de sustrato sobre los parámetros cinéticos y estequiométricos.

2. Materiales y Métodos

2.1. Barros activados y aclimatación de los barros activados al bisfenol A

La biomasa para la realización de los ensayos fue obtenida a partir de dos plantas de tratamiento de efluentes por barros activados a escala laboratorio (4.5 L). Las condiciones de operación de las plantas fueron las siguientes: temperatura = 20 ± 2 °C, tiempo de residencia hidráulico = 2 días, tiempo de residencia celular = 30 o 45 días. Las plantas fueron alimentadas con un medio de cultivo sintético compuesto por 1500 mg de suero de queso deshidratado, 94 mg de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ y 1030 mg de NaHCO_3 disuelto en un litro de agua. El oxígeno fue suministrado mediante burbujeadores que también proveían de agitación; la concentración de oxígeno disuelto fue mayor a $4 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$. En estado estacionario el pH de las plantas fue de 7.0 ± 0.5 .

Previo a su utilización en los ensayos, la biomasa obtenida a partir de las dos plantas de tratamiento de efluentes fue aclimatada a la presencia de BFA. Para tal fin, la biomasa fue centrifugada y resuspendida en buffer fosfato (KH_2PO_4 2 g L^{-1} ; K_2HPO_4 0.5 g L^{-1} , pH = 7). Se adicionaron además las soluciones de micronutrientes M1 y M2 (1 ml L^{-1}). La composición de la solución M1 fue (expresada como g/100ml): $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.3, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.075, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 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, BO_3H_3 0.01, KI 0.01. La aclimatación de la biomasa fue monitoreada mediante la medición de la concentración de BFA en función del tiempo.

2.2. Ensayos de biodegradación

La biodegradación de los diferentes compuestos fue estudiada empleando una técnica respirométrica. Los ensayos respirométricos se realizaron en respirómetro abierto compuesto por un reactor cilíndrico (volumen total = 500ml), control de temperatura (25 ± 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 que permitía la adquisición de un dato cada 5 segundos. La calibración del respirómetro se realizó mediante un método dinámico (Ros, 1993). El experimento consistía en colocar en el respirómetro 500 mL de una muestra de barros aclimatados al BFA con una concentración de biomasa conocida ($2-2.5$ gSST L⁻¹). Luego se agregaba un pulso de una solución stock del sustrato en estudio (BFA, 4-HAF, A-4HB, 4-HB) para obtener la concentración final deseada. En todo momento se monitoreó la concentración de oxígeno disuelto (C, mgO₂ L⁻¹) en el respirómetro en función del tiempo. A partir del balance de masa para el OD se calculó la velocidad de respiración (R_T, mgO₂ L⁻¹ h⁻¹) mediante la siguiente expresión:

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

donde $K_L a$ (h⁻¹) es el coeficiente global de transferencia de oxígeno y C_S (mgO₂ L⁻¹) la concentración de OD de saturación en las condiciones de operación.

La velocidad total de respiración 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, mgO₂ L⁻¹) durante la oxidación de S resulta (Vanrollehem y col., 1994):

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

A partir de este valor se calculó el coeficiente de oxidación del sustrato ($Y_{O/S}$, mgO₂ mgS⁻¹) como el cociente entre OC y la concentración inicial de sustrato agregado (mgS L⁻¹). Con el objeto de normalizar los resultados y así poder realizar comparaciones válidas entre experimentos con diferente concentración de biomasa (X, gSST L⁻¹), los valores de las velocidades (R) fueron expresados por unidad de biomasa. Por lo tanto:

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

donde q_{O_2} (mgO₂ gSST⁻¹ h⁻¹) es la velocidad específica de consumo de oxígeno, R_{ex} es la velocidad de consumo de oxígeno correspondiente a cada sustrato (mgO₂ L⁻¹ h⁻¹), y X_0 es la concentración de biomasa en el respirómetro. Cuando se analizó el efecto del TRC, se adicionaron pulsos de 20 mg L⁻¹ para todos los sustratos en estudio.

Para analizar el efecto de la concentración de cada sustrato, la misma se incrementó diariamente. En el caso del BFA, la concentración testeada varió entre 5 y 40 mg L⁻¹,

mientras que para la 4-HAF, A-4HB y 4-HB la concentración estudiada se encontró entre 10 y 120 mg L⁻¹. En todos los casos se realizaron tres ciclos de incremento en la concentración de sustrato. Se utilizaron barros activados provenientes de una planta operando con un TRC de 30 días y aclimatados al BFA.

2.3. Técnicas analíticas

La concentración de biomasa fue medida como sólidos suspendidos totales (SST, mg L⁻¹). La concentración de BFA durante la aclimatación de los barros activados fue determinada utilizando el método colorimétrico de la 4-aminoantipirina (Modaressi y col., 2005).

3. Resultados y discusión

3.1. Efecto del tiempo de residencia celular (TRC)

La Figura 1 muestra las curvas respirométricas correspondientes a la adición de pulsos sucesivos (20 mg L⁻¹) de los cuatro sustratos en estudio para barros activados con TRC de 30 y 45 días (BA₃₀, BA₄₅). Los valores de q_{O2} correspondientes al BFA fueron similares para ambos tipos de biomasa. Sin embargo, aunque los BA con TRC de 30 y 45 días fueron capaces de degradar todos los compuestos estudiados, la velocidad específica de consumo de oxígeno (q_{O2}) obtenida mediante la adición de 4-HAF, A-4HB y 4-HB fue mayor para BA₃₀ que para BA₄₅. Por otra parte, en la Figura 1 puede observarse que la velocidad de biodegradación de BFA y 4-HAF se mantuvo aproximadamente constante en función de la adición de los pulsos sucesivos. Cada curva respirométrica correspondiente a ambos compuestos duró aproximadamente entre 5 y 6 horas; por lo tanto, no fue posible aplicar más de un pulso de sustrato por día. En contraposición, cada curva respirométrica correspondiente al A-4HB y 4-HB tuvo una duración de aproximadamente 1 hora, lo cual permitió adicionar más de un pulso de sustrato por día. Para ambos sustratos la adición de pulsos sucesivos generó un aumento progresivo de los valores de q_{O2} durante cada día de experimentación.

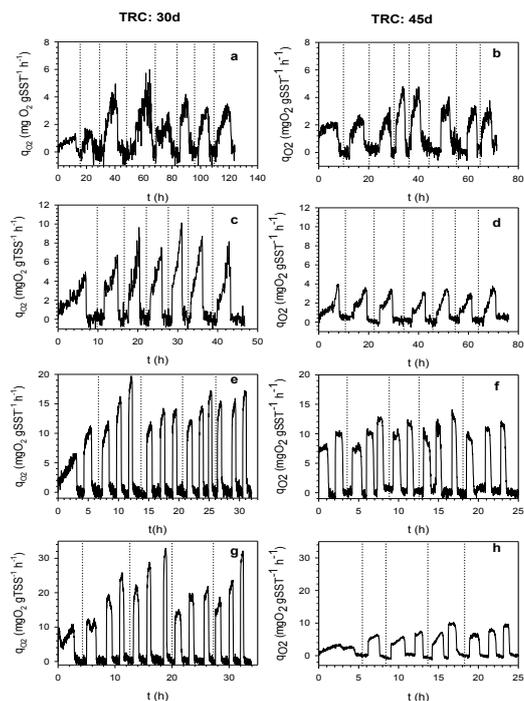


Fig.1. Efecto del TRC en la velocidad de degradación de BFA, 4-HAF, A-4HB y 4-HB por barros activados. (a, b) BFA, (c, d) 4-HAF, (e, f) A-4HB y (g, h) 4-HB. Las líneas punteadas separan los días de duración del ensayo en cada caso. Cada curva representa la adición de un pulso de sustrato.

3.2. Efecto de la concentración del sustrato

La concentración de sustrato se incrementó diariamente (entre 5-40 mg L⁻¹ para BFA y entre 10-120 mg L⁻¹ para los demás sustratos). La Figura 2 muestra los resultados correspondientes al BFA. El aumento en la concentración de BFA provocó un incremento en el tiempo requerido para el consumo del sustrato. Sin embargo, los resultados correspondientes a los tres ciclos (C1, C2, C3) fueron similares.

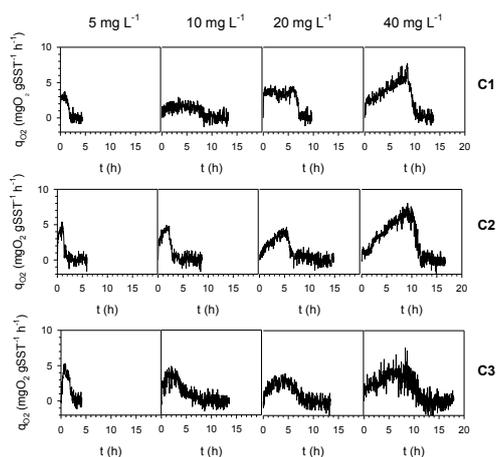


Fig.2. Curvas respirométricas correspondientes al aumento en la concentración de BFA en los ciclos sucesivos (C1, C2, C3).

La Figura 3 muestra los resultados obtenidos utilizando 4-HAF. Considerando una misma concentración en los tres ciclos sucesivos (C1, C2, C3), puede observarse que los valores de q_{O_2} se incrementaron paulatinamente y disminuyó el tiempo requerido para el

agotamiento del sustrato. Es importante señalar que, si bien los BA se encontraban previamente aclimatados al BFA, los resultados que se presentan en la Figura 3 indicarían una nueva aclimatación ante el cambio de sustrato (de BFA a 4-HAF) como única fuente de carbono y energía. Para cada concentración en estudio, durante el primer ciclo, los valores de q_{O_2} fueron significativamente menores que aquellos obtenidos en los ciclos siguientes; asimismo, el tiempo requerido para el agotamiento del sustrato durante el C1 fue considerablemente mayor que el requerido en los ciclos C2 y C3. Si bien los resultados indicarían que la nueva etapa de aclimatación se produciría durante el C1, no se observó una estabilización de los valores de q_{O_2} en los tres ciclos sucesivos. Por tal motivo, no fue posible sacar conclusiones en relación al efecto de la concentración de sustrato en este caso.

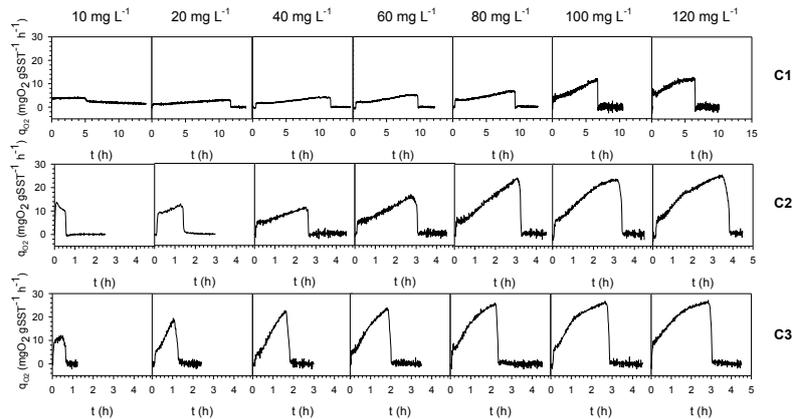


Fig.3. Curvas respirométricas correspondientes al aumento en la concentración de 4-HAF en los ciclos sucesivos (C1, C2, C3).

Los resultados obtenidos utilizando A-4HB (Fig.4) y 4-HB (Fig.5) fueron similares a los encontrados con 4-HAF. Sin embargo, durante el C3, la adición de 120 mg A-4HB L⁻¹ provocó un descenso en el valor de q_{O_2} y un leve aumento en la duración del consumo de sustrato en relación al C2. En el caso del 4-HB se observó un comportamiento similar a partir de la adición de 60 mg 4-HB L⁻¹ en el C3, disminuyendo los valores de q_{O_2} y aumentando el tiempo requerido para el consumo del sustrato en relación a los valores del C2. A partir de los valores de OC (ec.2) se calcularon los valores correspondientes al coeficiente de oxidación para cada uno de los compuestos en estudio ($Y_{O/S}$, molO₂ molS⁻¹) (Fig. 6)

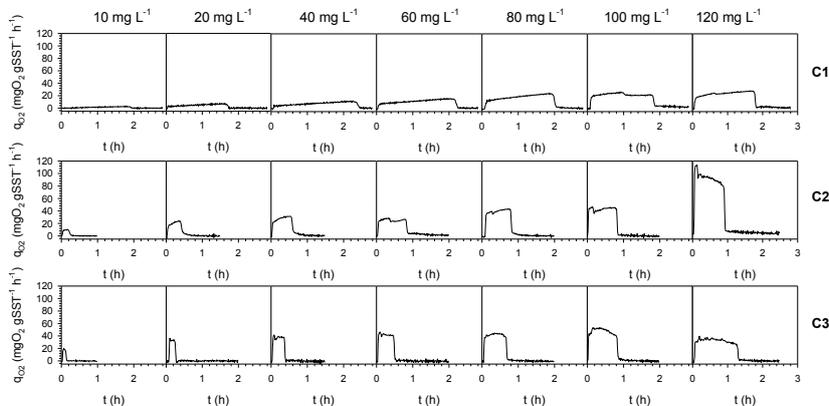


Fig.4. Curvas respirométricas correspondientes al aumento en la concentración de A-4HB en los ciclos sucesivos (C1, C2, C3).

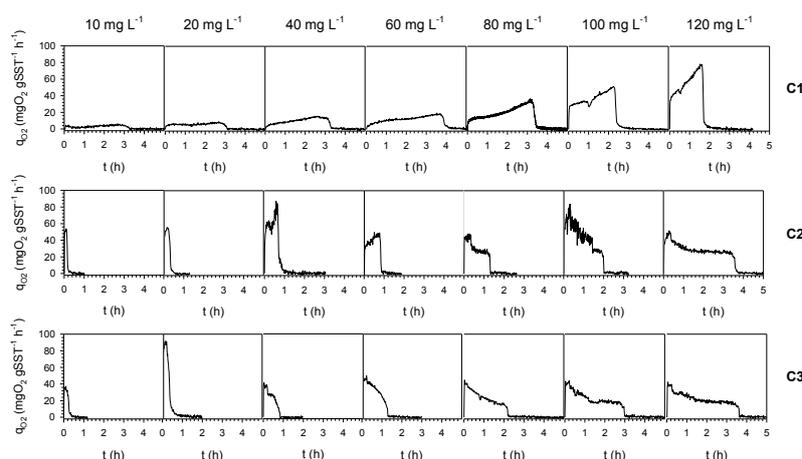


Fig. 5. Curvas respirométricas correspondientes al aumento en la concentración de 4-HB en los ciclos sucesivos (C1, C2, C3).

La Figura 6 muestra que la estequiometría de las reacciones de degradación de cada uno de los sustratos testeados no se ve afectada por los factores analizados (TRC, concentración de sustrato y aclimatación). Según la reacción de oxidación total, la cantidad máxima de moles de O₂ que se utilizan en la oxidación completa de cada uno de los sustratos debe ser la siguiente: 18 molO₂ mol BFA⁻¹, 9 molO₂ mol 4-HAF⁻¹, 7 molO₂ mol A-4HB⁻¹, y 7.5 molO₂ 4-HB⁻¹. Como puede observarse en la Figura 6, los coeficientes de oxidación obtenidos fueron menores al valor correspondiente para su oxidación total. Por otra parte, considerando la ruta metabólica para la degradación microbiana aeróbica de BFA propuesta en literatura (Spivack y col., 1994), los valores de $Y_{O/S}$ obtenidos sugieren que la velocidad de respiración de los microorganismos disminuye hasta el valor basal (R_{end}) cuando el BFA, A-4HB y 4-HB son oxidados hasta al menos 3-carboxi-cis,cis-muconato. En el caso de la 4-HAF, la velocidad de respiración microbiana disminuiría hasta el valor de la respiración endógena cuando el compuesto es oxidado al menos hasta ácido 4-cis-cis-hidroximucónico semialdehído. Tanto este compuesto como el 3-carboxi-cis,cis-muconato son fácilmente metabolizados para formar intermediarios metabólicos en el ciclo de Krebs (UMBBD, 2012), lo que sugiere que la oxidación de todos los compuestos en estudio se produce hasta compuestos que no presentan toxicidad y que pueden ser degradados fácilmente.

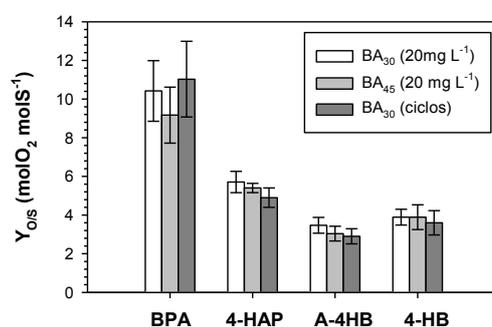


Fig.6. Coeficiente de oxidación de sustrato ($Y_{O/S}$) correspondiente a BFA, 4-HAF, A-4HB y 4-HB obtenido para BA₃₀ y BA₄₅ mediante la adición de pulsos de concentración constante (20 mg L⁻¹), y para BA₃₀ en los ciclos sucesivos con incremento en la concentración de cada sustrato en estudio. Las barras indican el desvío estándar.

4. Conclusiones

- Los barros activados aclimatados al BFA fueron capaces de degradar todos los compuestos en estudio.
- El TRC no afectó la cinética de degradación de BFA y 4-HAF. Por el contrario, la cinética de degradación de A-4HB y 4-HB fue mayor para BA₃₀ que para BA₄₅.
- La cinética de degradación de BFA fue similar en los tres ciclos sucesivos. Sin embargo, el comportamiento observado para los demás sustratos indicó una nueva etapa de aclimatación de la biomasa.
- La estequiometría de la reacción de degradación de todos los sustratos estudiados no fue afectada por el TRC o por el incremento en la concentración de sustrato. Los valores de $Y_{O/S}$ sugieren que la oxidación de los compuestos en estudio se produjo al menos hasta 3-carboxi-cis,cis-muconato (BFA, A-4HB, 4-HB) o ácido 4-cis-cis-hidroximucónico semialdehído (4-HAF).

5. Bibliografía

- Modaressi K.; Taylor K.E.; Bewtra J.K.; Biswas N. (2005). Laccase-catalyzed removal of bisphenol-A from water: Protective effect of PEG on enzyme activity. *Water Research* 39: 4309-4316.
- Ros M. (1993). *Respirometry of activated sludge*. Technomic, USA.
- Sakai K., Yamanaka H., Moriyoshi K., Ohmoto T., Ohe T. (2007). Biodegradation of bisphenol A and related compounds by *Sphingomonas* sp. strain BP-7 isolated from seawater. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71: 51-57.
- Sasaki M., Maki J-i., Oshiman K-i., Matsumura Y., Tsuchido T. (2005). Biodegradation of bisphenol A by cells and cell lysate from *Sphingomonas* sp. strain AO1. *Biodegrad.* 16: 449-459.
- Spivack J., Leib T.K., Lobos J.H. (1994). Novel pathway for bacterial metabolism of bisphenol A. Rearrangements and stilbene cleavage in bisphenol A metabolism. *J. Biol. Chem.* 269: 7323-7329.
- Vanrolleghem P.A., Kong Z., Rombouts G., Verstraete W. (1994). An on-line respirographic biosensor for the characterisation of load and toxicity of wastewaters. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 59: 321-333.
- Zhang C., Zeng G., Yuan L., Yu J., Li J., Huang G., Xi B., Liu H. (2007). Aerobic degradation of bisphenol A by *Achromobacter xylosoxidans* strain B-16 isolated from compost leachate of municipal solid waste. *Chemosphere* 68: 181-190.