

DEGRADACIÓN AERÓBICA DE BISFENOL A POR BARROS ACTIVADOS

A.M. Ferro Orozco^a, E.M. Contreras^{b,c} y N. E. Zaritzky^{a,b}

^a Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA). CONICET-La Plata. Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, La Plata, Argentina. ^b Facultad de Ingeniería, UNLP, La Plata, Argentina. ^c Instituto de Investigaciones en Ciencia y Tecnología de Materiales (INTEMA). CONICET-Mar del Plata. UNMdP Mar del Plata, Argentina.

mferro@cidca.org.ar

Introducción

El bisfenol A (BFA) es un compuesto industrialmente muy importante ya que constituye uno de los materiales necesarios para la producción de policarbonatos, resinas epoxi y otros plásticos (Sasaki y col., 2005). Este compuesto es levemente tóxico para peces e invertebrados (Staples, 1998), y ha sido descrito como moderadamente estrogénico (Kang y col., 2006). Sin embargo, como resultado de su amplio uso ha sido detectado frecuentemente tanto en aguas residuales municipales como industriales.

Una de las metodologías propuestas para lograr la descontaminación de aguas residuales conteniendo BFA es la utilización de cultivos microbianos puros o mixtos (Sakai y col., 2007; Zhang y col., 2007). Si bien el BFA puede ser oxidado completamente, en varios casos ha sido descrita la acumulación de 4-hidroxiacetofenona (4-HAF), 4-hidroxibenzaldehído (4-HBA) y ácido 4-hidroxibenzoico (A-4HB) como sus principales productos (Sasaki y col., 2005; Sakai y col., 2007; Zhang y col., 2007). Por esta razón, la degradación de dicho compuesto debe ser evaluada no solo considerando el propio BFA, sino también sus productos de degradación. De esta manera, se obtendrá una mejor estimación del impacto que podría conllevar la descarga de tales aguas residuales en el medio ambiente. En este sentido, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la degradación aeróbica de BFA y sus principales productos de degradación empleando barros activados.

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 $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ y 1030 mg de NaHCO_3 disueltos en un litro de agua. Las condiciones de operación de la planta fueron las siguientes: temperatura = 20 ± 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 ± 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 mg L^{-1}) y las soluciones de micronutrientes M1 y M2 (1 ml L^{-1}). La composición de la solución M1 fue (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 al BFA fue monitoreada mediante la medición de la concentración de fenoles totales en función del tiempo.

Ensayos de biodegradación.

a) Reactores tipo batch. Se utilizaron reactores batch (500 ml) para estudiar la degradación de BFA, 4-HAF, 4-HBA y A-4HB. En todos los casos la concentración del sustrato en estudio fue de 40 mg L^{-1} . La biodegradación fue monitoreada mediante la medición del consumo de carbono orgánico total (COT) en función del tiempo.

b) Respirometría. Los ensayos respirométricos se realizaron en respirómetro abierto compuesto por un reactor cilíndrico (volumen total = 500 mL), control de temperatura ($25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$), 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 (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 ($2\text{-}2.5 \text{ gSST L}^{-1}$). Luego se agregaba un pulso de una solución stock del sustrato en estudio (BFA, 4-HAF, 4-HBA, A-4HB) para obtener la concentración final deseada (20 mg 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 $K_L a$ (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 (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 ($Y_{O/S}$, $\text{mgO}_2 \text{ mgS}^{-1}$) 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} ($\text{mgO}_2 \text{ gSST}^{-1} \text{ h}^{-1}$) es la velocidad específica de consumo de oxígeno de cada uno de los sustratos en estudio, R_{ex} es la velocidad de consumo de O_2

correspondiente a cada sustrato ($\text{mgO}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$), y X_0 corresponde a la concentración de biomasa en el respirómetro.

Técnicas analíticas. La concentración de biomasa fue medida como sólidos suspendidos totales (SST, mg L^{-1}). La concentración de los diferentes sustratos fue determinada como carbono orgánico total (COT, mg L^{-1}). La concentración de BFA durante la aclimatación de los barros activados fue determinada como fenoles totales (mg L^{-1}) mediante la utilización del método colorimétrico de la 4-aminoantipirina (Modaressi y col., 2005).

Resultados y discusión

Biodegradación de BFA y sus productos en reactores batch. Los ensayos realizados en reactores batch fueron llevados a cabo con el fin de analizar, en una primera instancia, la capacidad de los barros activados para degradar los diferentes sustratos en estudio. La Figura 1 muestra el consumo de BFA, 4-HAF, 4-HBA y A-4HB en función del tiempo.

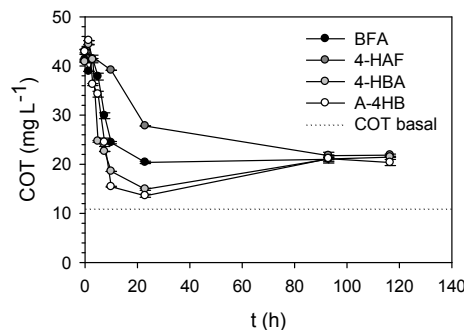


Figura 1. Degradación de bisfenol A y sus principales productos de degradación en función del tiempo en reactores batch de barros activados. La línea punteada señala la concentración de COT basal en el medio de cultivo antes de la adición del sustrato en estudio. Las barras indican el desvío estándar.

Los barros aclimatados al BFA fueron capaces de degradar todos los compuestos en estudio; sin embargo, la velocidad de consumo de los distintos sustratos fue variable. La menor velocidad correspondió al consumo de 4-HAF, mientras que las mayores velocidades fueron observadas para el 4-HBA y el A-4HB, siendo estas últimas similares entre si y mayores a la correspondiente al consumo de BFA. Por otra parte, el mayor porcentaje de remoción alcanzado para cada uno de los sustratos en estudio fue de 70 (23 h), 75 (93 h), 87 (23 h) y 90 (23 h) % para el BFA, 4-HAF, 4-HBA y A-4HB respectivamente. Cabe aclarar que el COT correspondiente al 4-HBA y A-4HB aumenta para tiempos mayores a las 23 horas debido a la lisis celular (Contreras y col., 2011). Estos resultados indican que no solo el 4-HBA y el A-4HB son consumidos con una mayor velocidad, sino que también la capacidad de consumo de dichos sustratos por los barros activados es mayor, removiéndose casi la totalidad del COT. Por otro lado, aunque el cultivo microbiano fue capaz de degradar el BFA y la 4-HAF, entre un 25 y 30% del COT medido se encontró presente hasta las 120 horas de duración de los ensayos.

Ensayos respirométricos. La Figura 2 muestra las curvas respirométricas correspondientes a la adición de pulsos sucesivos de BFA (Fig. 2a), 4-HAF (Fig. 2b), 4-HBA (Fig. 2c) y A-4HB (Fig. 2d).

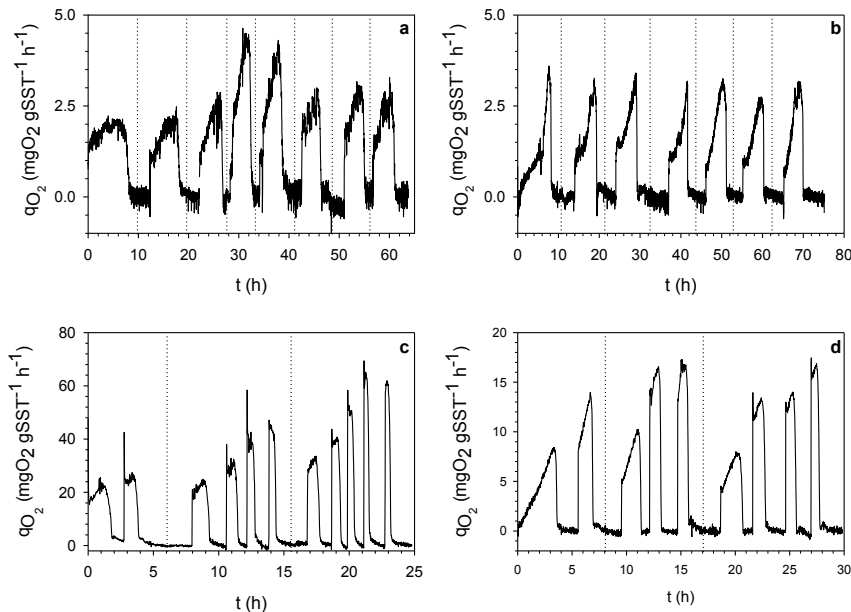


Figura 2. Efecto de la adición de pulsos sucesivos de sustrato sobre la velocidad específica de consumo de oxígeno (q_{O_2}) de barros activados. (a) BFA, (b) 4-HAF, (c) 4-HBA y (d) A-4HB. Las líneas punteadas separan los días de duración del ensayo en cada caso. Cada curva representa la adición de un pulso de sustrato.

Los ensayos respirométricos mostraron que existía una gran similitud en la manera en que el BFA y la 4-HAF eran oxidados. 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. Además, la velocidad de biodegradación de BFA y 4-HAF fue similar (3.02 ± 0.71 y 2.97 ± 0.22 $\text{mgO}_2 \text{ gSST}^{-1} \text{ h}^{-1}$ para BFA y 4-HAF respectivamente) manteniéndose aproximadamente constante en función de los pulsos sucesivos de cada sustrato (Fig. 2a,b). En contraposición, cada curva respirométrica correspondiente al 4-HBA y A-4HB 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_{O_2} (Fig. 2c,d). Los valores de q_{O_2} variaron entre 23 y 69 $\text{mgO}_2 \text{ gSST}^{-1} \text{ h}^{-1}$ para el 4-HBA, mientras que para el A-4HB se encontraron entre 8 y 17 $\text{mgO}_2 \text{ gSST}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Por este motivo, no fue posible obtener un valor de q_{O_2} promedio para estos dos sustratos; sin embargo, fueron claramente mayores a los observados para el BFA y la 4-HAF.

Los resultados encontrados mediante la realización de los ensayos en reactores batch y los ensayos respirométricos fueron similares. En ambos casos las velocidades de consumo de 4-HBA y A-4HB fueron similares entre si y claramente mayores a las correspondientes al BFA y la 4-HAF. Algunos investigadores han sugerido que la acumulación de 4-HAF durante la degradación de BFA podría generar tanto una disminución de la velocidad de consumo como la detención total del consumo de BFA (Sasaki y col., 2005; Zhang y col., 2007). Asimismo, de acuerdo con los resultados informados en el presente trabajo, han sido informadas menores velocidades de consumo para la 4-HAF con respecto al BFA para diferentes cultivos microbianos. Por ejemplo, Ohmoto y Ohe (2007) aislaron diversas cepas de *Pseudomonas* sp. a partir de un cultivo de agua de mar enriquecido en bisfenol A. Estos investigadores encontraron que una de las cepas tenía la capacidad de degradar el BFA así como también sus intermediarios metabólicos, 4-HAF, 4-HBA y A-4HB. Los mencionados autores también informaron que la

velocidad de degradación de la 4-HAF fue la menor. Una menor velocidad de degradación correspondiente a la 4-HAF (Ohmoto y Ohe, 2007; presente trabajo), así como también la disminución en la velocidad de degradación de BFA debido a la acumulación de 4-HAF (Sasaki y col., 2005; Zhang y col., 2007), podrían indicar que la degradación de dicho compuesto constituye un paso limitante en la degradación de bisfenol A.

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. 3).

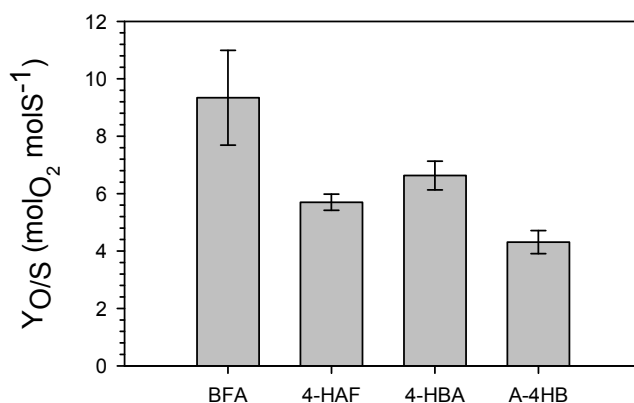


Figura 3. Coeficiente de oxidación de sustrato ($Y_{O/S}$) correspondiente a BFA, 4-HAF, 4-HBA y A-4HB. Las barras indican un intervalo de confianza del 95%.

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, 7.5 molO₂ 4-HBA⁻¹ y 7 molO₂ mol A-4HB⁻¹. Como puede observarse en la Figura 3, a excepción del valor correspondiente al 4-HBA, los coeficientes de oxidación obtenidos fueron menores al valor correspondiente para su oxidación total. Esto indica que solo el 4-HBA habría sido oxidado completamente. 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 y A-4HB 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.

Conclusiones

Los barros activados aclimatados al BFA fueron capaces de degradar todos los compuestos en estudio. La velocidad de biodegradación de BFA y 4-HAF fue menor a la encontrada para el 4-HBA y el A-4HB, indicando que la degradación de la 4-HAF podría constituir un paso limitante en la degradación del bisfenol A.

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 y A-4HB) o ácido 4-cis-cis-

hidroximucónico semialdehído (4-HAF). Por otra parte, el 4-HBA habría sido oxidado completamente.

Palabras clave: Bisfenol A, 4-hidroxiacetofenona, 4-hidroxibenzaldehído, ácido 4-hidroxibenzoico, barros activados.

Agradecimientos

Los autores expresan su agradecimiento por el apoyo financiero al CONICET, a la UNLP y al ANCyPT, ARGENTINA.

Bibliografía

Kang J.H., Kondo F., Katayama Y., 2006. *Human exposure to bisphenol A*. Toxicol. 226, 79-89.

Contreras E.M., Ferro Orozco A.M., Zaritzky N.E. 2011. Biological Cr(VI) removal coupled with biomass growth, biomass decay, and multiple substrate limitation. *Wat. Res.* 45, 3034-3046.

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.

Staples C.A., Dorn P.B., Klecka G.M., O'Block S.T., Harris L.R., 1998. A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A. *Chemosphere* 36, 2149-2173.

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.