

ESTUDIO DE LA BIOOXIDACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS POR LODOS ACTIVADOS MEDIANTE RESPIROMETRÍA ABIERTA

C. C. Lobo^{a*}, E. M. Contreras^{b,c} y N. C. Bertola^a

^a Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA). CONICET-La Plata. Fac. de Cs. Exactas, UNLP, 47 y 116 (1900) La Plata, Argentina.

^b Facultad de Ingeniería, UNLP, 48 y 115 (1900) La Plata, Argentina.

^c Instituto de Investigaciones en Ciencia y Tecnología de Materiales (INTEMA). CONICET-Mar del Plata. Av. Juan B. Justo 4302 (7600) Mar del Plata, Argentina.

*cloblo@cidca.org.ar

INTRODUCCIÓN

Los compuestos fenólicos son utilizados en varias industrias (petroquímicas, farmacéuticas, plásticas) y están presentes en una amplia variedad de efluentes (USEPA, 2000). El fenol y sus derivados son compuestos tóxicos que tienden a acumularse en los cuerpos receptores cuando las aguas residuales son desechadas sin un tratamiento adecuado. Existen en la actualidad diversos procesos de degradación de compuestos fenólicos que han demostrado ser efectivos, estos incluyen tratamientos fisicoquímicos (Fenton, ozonización, UV, peróxido de hidrógeno) y biológicos (Gogate y Pandit, 2004). Debido a que los compuestos fenólicos poseen un impacto negativo sobre los microorganismos presentes en los lodos activados, generalmente debe emplearse una combinación de tratamientos químicos y biológicos (Riccio y col, 2004). Sin embargo, durante la oxidación química se generan compuestos que suelen ser más tóxicos y menos biodegradables que los compuestos originales (Hsu y col, 2004; Santos y col, 2004). Aunque la biodegradación de fenol ha sido ampliamente investigada, la biodegradación de los compuestos generados por oxidación parcial de fenol ha recibido menos atención (Orupöld y col, 2001). Se ha informado que hidroquinona, catecol y benzoquinona pueden inhibir los lodos activados (Santos y col, 2004; Suárez-Ojeda y col, 2007). Por ello es importante conocer la forma en que un lodo activado puede responder a cambios en la composición y concentración de compuestos tóxicos en aguas residuales (Orupöld y col, 1999). La respirometría es una técnica ampliamente utilizada para el estudio de la biooxidación de compuestos tóxicos. Esta técnica ha sido empleada para determinar la demanda biológica de oxígeno, en la evaluación de parámetros cinéticos y la toxicidad de aguas residuales (Lepik y col, 2003; Marsili-Libelli y Tabani, 2002; Vanrolleghem, 2002).

En el presente trabajo la técnica de respirometría abierta fue utilizada para estudiar el efecto tóxico en forma individual y conjunta de fenol y de dos intermediarios generados durante la oxidación parcial de fenol (pirogalol, p-hidroquinona), en la velocidad de respiración de lodos activados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos. El fenol y todas las sales inorgánicas fueron de grado reactivo de Anedra (San Fernando, Argentina). El pirogalol y p-hidroquinona fueron de grado reactivo de Biomed Inc. (Aurora, Ohio).

Lodos Activados y condiciones de cultivo. Los lodos activados fueron cultivados en un reactor semicontinuo de escala laboratorio (2.5 L); el tiempo de residencia hidráulico fue de 3.3 días y el tiempo de residencia celular de 45 días. La concentración de oxígeno disuelto fue mayor a $4 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}\text{h}^{-1}$, la concentración de biomasa fue de 6 g L^{-1} y el pH final fue ajustado en 8. La biomasa fue aclimatada con un medio de cultivo con 300 mg L^{-1} de fenol como única fuente de carbono y energía

(Nuhoglu e Yalcin, 2005). Cuando se alcanzó el estado estacionario, los lodos activados fueron utilizados como fuente de biomasa para todos los ensayos de respirometría. La muestra de los lodos activados fue centrifugada a 2000 rpm y los lodos fueron resuspendidos en 500 ml de buffer fosfato (K_2HPO_4 , 1000 mg L⁻¹; KH_2PO_4 , 500 mg L⁻¹). El pH fue ajustado en 7,5 por medio de adición de gotas de una solución concentrada de NaOH o H₂SO₄ según fuera necesario. Los lodos lavados fueron colocados en el respirómetro. La aireación fue mantenida estable en 1 L min⁻¹ utilizando un caudalímetro de alta precisión. Cuando se alcanzó una concentración estable de OD se adicionó un pulso del compuesto en estudio. Se realizaron pulsos sucesivos individuales de 100 mg L⁻¹ de cada uno de los siguientes compuestos: fenol, pirogalol y p-hidroquinona. Además, se realizó el estudio de la biooxidación conjunta de 100 mg L⁻¹ de fenol + 50 mg L⁻¹ de pirogalol y de 100 mg L⁻¹ de fenol + 50 mg L⁻¹ de p-hidroquinona.

Ensayos respirométricos. Los ensayos de respirometría fueron realizados en un respirómetro de 500 ml. La muestra fue agitada y aireada de modo que la concentración de oxígeno disuelto (OD) fuera mayor a 4 mgO₂ L⁻¹. La concentración de OD se determinó con un electrodo de oxígeno (YSI modelo 5739) conectado a una computadora. Antes de cada pulso del compuesto a estudiar se determinó el coeficiente de transferencia de oxígeno ($k_L a$) y la velocidad de respiración endógena (OUR_{en}) mediante un método dinámico (Ros, 1993). Posteriormente, se determinó la velocidad de respiración exógena (OUR_{ex}) que se produce en respuesta al agregado del compuesto ensayado. Cuando se realiza el agregado de un sustrato, aumenta la velocidad de respiración y consecuentemente, la concentración de OD disminuye. A partir del balance de masa de OD en el reactor se obtiene:

$$OUR_{ex} = k_L a (C_s - C) - OUR_{en} - \frac{dC}{dt} \quad (\text{Ecuación 1})$$

donde C y C_s son las concentraciones instantánea y de saturación de OD, respectivamente. Conociendo C en función del tiempo y asumiendo que OUR_{en} es constante durante todo el experimento, la ec.1 permite calcular la velocidad de respiración asociada al consumo del sustrato agregado (OUR_{ex}). El coeficiente de oxidación ($Y_{O/S}$), el cual representa la cantidad de oxígeno consumido por unidad de sustrato oxidado, se calcula como:

$$Y_{O/S} = \frac{OC}{S_0} = \frac{\int OUR_{ex} dt}{S_0} \quad (\text{Ecuación 2})$$

donde OC es el oxígeno consumido durante la oxidación del sustrato y S₀ es la concentración inicial del compuesto estudiado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto del agregado sucesivo de compuestos fenólicos sobre OUR_{ex} y OC. Los resultados obtenidos evidenciaron que los lodos activados aclimatados a fenol fueron capaces de biooxidar individualmente todos los compuestos estudiados. Sin embargo, las velocidades de oxidación de los compuestos fueron diferentes (Fig. 1). El valor inicial de OUR_{ex} para fenol fue aproximadamente 180 mgO₂ L⁻¹ h⁻¹, este valor fue superior al obtenido para pirogalol y p-hidroquinona (100 y 42 mgO₂ L⁻¹ h⁻¹,

respectivamente). Se pudo determinar que los valores de OUR_{ex} para fenol y pirogalol disminuyeron en función del número de pulsos de sustrato agregado. Sin embargo, mientras la actividad de respiración para fenol disminuyó un 40% con respecto al valor inicial en el pulso número 20 (Fig. 1a), los valores de OUR_{ex} para pirogalol disminuyeron en un 70% en el pulso número 7 (Fig. 1b). Por el contrario, los valores de OUR_{ex} para p-hidroquinona se mantuvieron aproximadamente constantes (Fig. 1c). Aunque la velocidad de oxidación de los compuestos estudiados fue función del número de pulso, el coeficiente $Y_{O/S}$ se mantuvo aproximadamente constante (Tabla 1). Los valores de $Y_{O/S}$ obtenidos para los compuestos fenólicos en este trabajo fueron similares a los informados por otros autores. Watanabe y col. (1996) informaron un valor de $Y_{O/S}$ para fenol de $0.68 \text{ mgO}_2 \text{ mgFenol}^{-1}$. Groseclose y Ribbons (1981), estudiaron la oxidación de pirogalol en extractos crudos de células de *Azobacter vinelandii* con resorcinol e informaron un valor de $Y_{O/S}$ para pirogalol de $0.29 \text{ mgO}_2 \text{ mgPirogalol}^{-1}$. Suárez-Ojeda y col. (2007) informaron un $Y_{O/S}$ de $0.66 \text{ mgO}_2 \text{ mgp-hidroquinona}^{-1}$ en lodos activados aclimatados a compuestos fenólicos, similar al obtenido en este estudio.

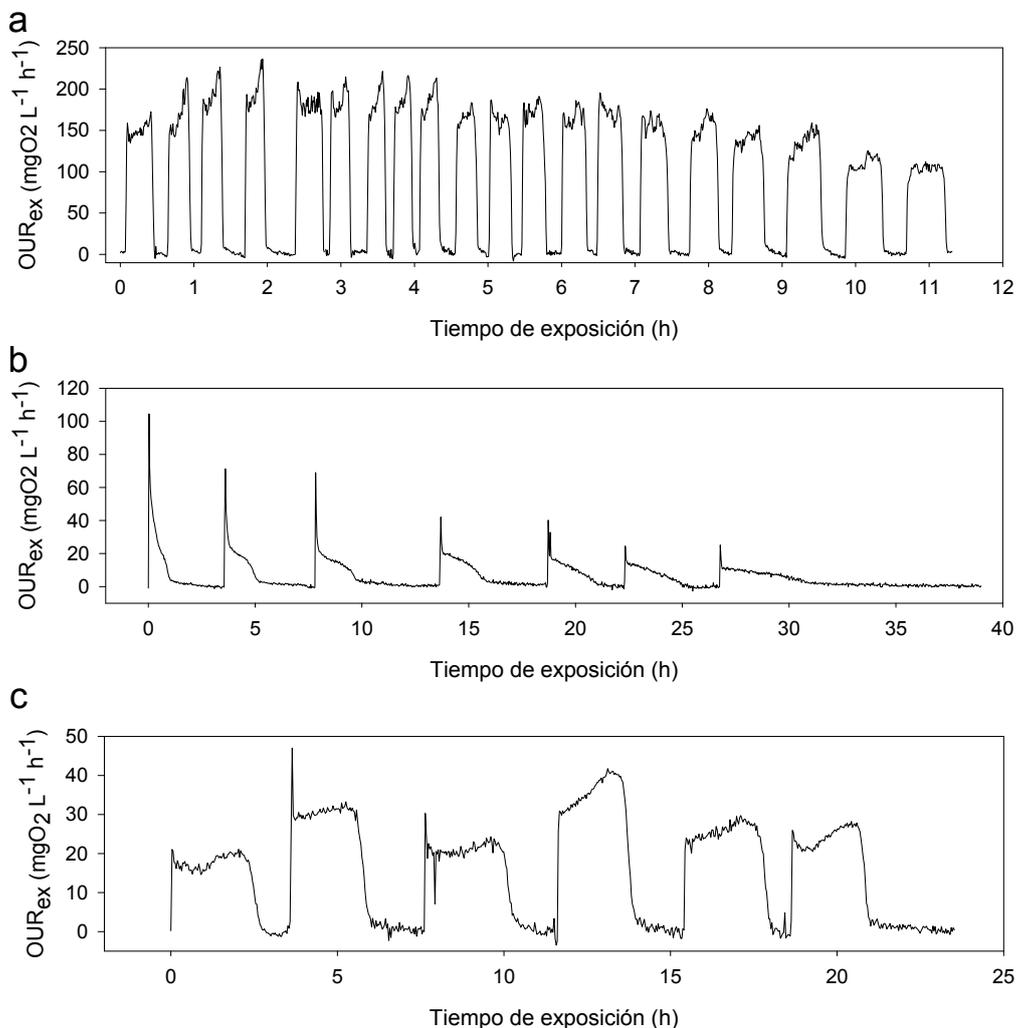


Figura 1. OUR_{ex} vs. Tiempo de exposición para pulsos individuales de: (a) Fenol, (b) Pirogalol, y (c) p-hidroquinona. Biomasa = 2.7 gTSSL^{-1} .

Tabla 1. Valores obtenidos de OC e $Y_{O/S}$ para los compuestos fenólicos estudiados

Ensayo	Compuesto	mg L ⁻¹	OC(mgO ₂ L ⁻¹)	$Y_{O/S}$ (mgO ₂ mgS ⁻¹)
Biooxidación individual	Fenol	100	53.7 ± 6.4	0.54 ± 0.06
	Pirogalol	100	31.8 ± 2.0	0.32 ± 0.02
	p-hidroquinona	100	59.9 ± 11.8	0.59 ± 0.12
Biooxidación conjunta	Fenol y pirogalol ¹	100+50	83.0 ± 7.1	NA*
	Fenol y p-hidroquinona ²	100+50	97.4 ± 8.2	NA
	Fenol+pirogalol	100+50	74.3 ± 20.9	NA
	Fenol+p-hidroquinona	100+50	134.7 ± 38.3	NA

¹Suma de los valores de OC para Fenol y Pirogalol en pulsos individuales. ² Suma de los valores de OC para Fenol y p-hidroquinona en pulsos individuales. * No aplicable.

Biooxidación conjunta de compuestos fenólicos. En los ensayos realizados con fenol+pirogalol (Fig. 2a) se observó un efecto de toxicidad acumulada sobre la biooxidación simultánea de fenol+pirogalol durante el primer día del ensayo (corridas 1 y 2). Posteriormente, en el segundo día del ensayo (corrida 3) se observó una cierta recuperación de la actividad para la biooxidación conjunta de fenol+pirogalol, la cual se perdió completamente en la corrida 5. Se determinó que el valor de oxígeno consumido (OC) durante la biooxidación conjunta de fenol+pirogalol fue de $74.34 \pm 20.9 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$; considerando el error experimental, este valor fue similar a la suma de los valores de OC de los compuestos individuales (Tabla 1). En el caso de fenol+p-hidroquinona (Fig. 2b) la biooxidación de los compuestos en forma individual y simultánea se mantuvo aproximadamente constante durante las corridas 1 y 2. Posteriormente, se evidenció una disminución de la actividad en las corridas número 3 y 4. Esto pudo ser consecuencia de un efecto de toxicidad de p-hidroquinona sobre los lodos activados aclimatados a fenol. Se determinó que el valor de OC para la mezcla fenol+p-hidroquinona fue de $134.7 \pm 38.3 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$; teniendo en cuenta los errores experimentales, el valor de OC obtenido para la mezcla fue similar a la suma de OC obtenidos en los pulsos individuales ($OC = 97.4 \pm 8.2 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$) (Tabla 1). En la Figura 3 se encuentran dos ejemplos de perfiles respirométricos correspondientes a pulsos simultáneos de fenol+pirogalol y fenol+p-hidroquinona. Los valores de OUR_{ex} obtenidos en el pulso simultáneo fueron menores a la suma de los perfiles de los pulsos individuales de fenol y pirogalol (Fig. 3a). Este comportamiento pudo ser consecuencia de un efecto inhibitorio de la mezcla fenol+pirogalol sobre los lodos aclimatados a fenol. Por el contrario, en los ensayos realizados con fenol y p-hidroquinona se observó que en las primeras dos corridas los valores de OUR_{ex} obtenidos en el pulso simultáneo fenol+p-hidroquinona fueron similares a la suma de los perfiles de los pulsos individuales (Fig. 3b). Posteriormente, los valores de OUR_{ex} obtenidos en el pulso simultáneo fueron menores a la suma de los perfiles de los pulsos individuales. Esto pudo ser consecuencia de un efecto de toxicidad acumulada de la mezcla fenol-p-hidroquinona sobre los lodos activados.

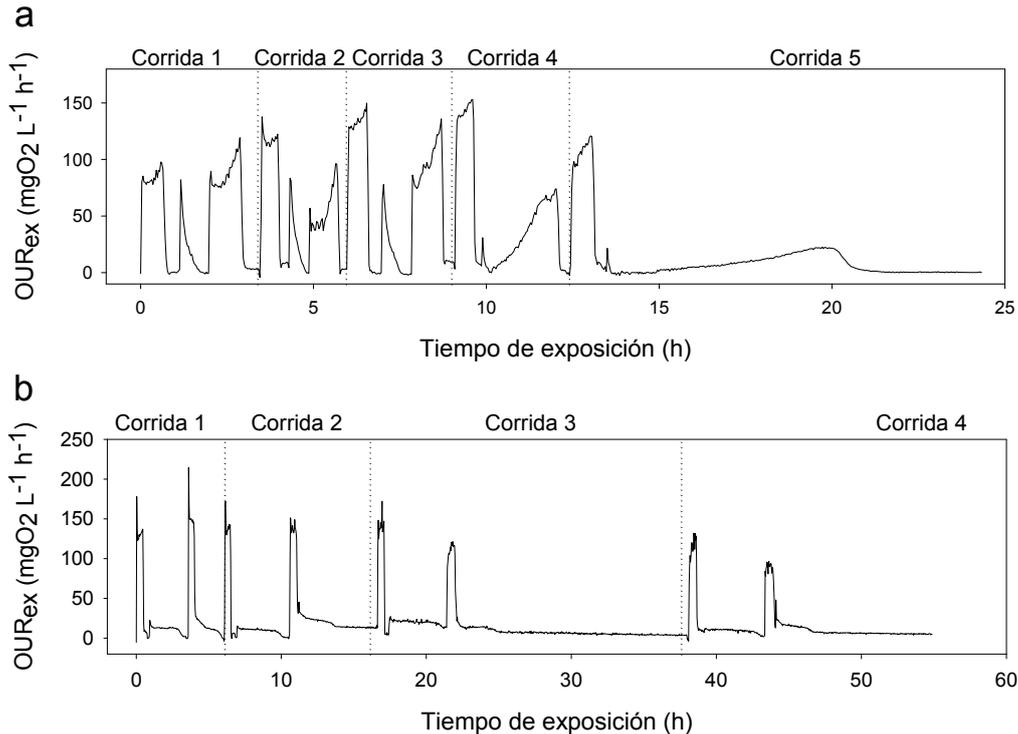


Figura 2. OUR_{ex} vs tiempo para: **(a)** fenol+pirogalol (fenol 100 mg L^{-1} , pirogalol 50 mg L^{-1} , fenol 100 mg L^{-1} y pirogalol 50 mg L^{-1}). **(b)** Fenol+p-hidroquinona (fenol 100 mg L^{-1} , p-hidroquinona 50 mg L^{-1} , fenol 100 mg L^{-1} y p-hidroquinona 50 mg L^{-1}).

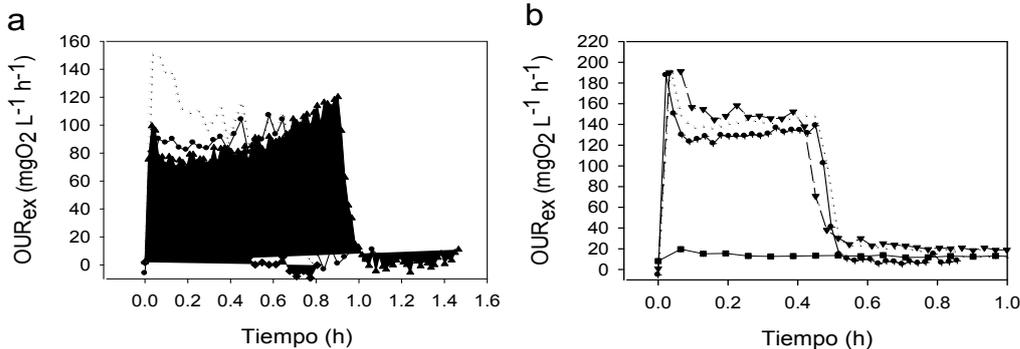


Figura 3. Perfiles respirométricos obtenidos para: **(a)** fenol+pirogalol: (●) 100 mg L^{-1} de fenol, (◆) 50 mg L^{-1} de pirogalol, (▲) 100 mg L^{-1} de fenol+ 50 mg L^{-1} de pirogalol, (---) suma de perfiles individuales de 100 mg L^{-1} de fenol y 50 mg L^{-1} de pirogalol. **(b)** fenol+p-hidroquinona: (●) 100 mg L^{-1} de fenol, (■) 50 mg L^{-1} de p-hidroquinona, (▼) 100 mg L^{-1} de fenol+ 50 mg L^{-1} de p-hidroquinona, (---) suma de perfiles individuales de 100 mg L^{-1} de fenol y 50 mg L^{-1} de p-hidroquinona.

CONCLUSIONES

Los lodos activados aclimatados a 300 mg L^{-1} de fenol fueron capaces de biooxidar fenol, pirogalol y p-hidroquinona individualmente y en forma conjunta. Durante el agregado de pulsos individuales sucesivos de fenol y pirogalol se observó un decrecimiento en la actividad de respiración, lo cual indicó cierto grado de toxicidad de los compuestos sobre su propia biooxidación. Por el contrario, la actividad respiratoria para p-hidroquinona se mantuvo constante. Asimismo, para todos los compuestos estudiados el coeficiente estequiométrico $Y_{O/S}$ permaneció constante. Los lodos activados presentaron un orden de preferencia en la biooxidación conjunta

de fenol+pirogalol; en presencia de esta mezcla se determinó la inhibición de la biooxidación de fenol. En presencia de fenol+p-hidroquinona los lodos oxidaron simultáneamente ambos compuestos. En todos los casos, el oxígeno consumido durante los pulsos simultáneos presentó similitud con la suma de los pulsos individuales. Los resultados obtenidos puede ser útiles en el desarrollo de un modelo matemático para describir la oxidación de los compuestos fenolicos estudiados.

PALABRAS CLAVE: fenol, pirogalol, p-hidroquinona, respirometría, biooxidación

AGRADECIMIENTOS: Los autores agradecen la financiación suministrada por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por la Universidad Nacional de la Plata y por el Proyecto PICT 2007-01212 de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, Argentina.

REFERENCIAS

- Gogate, A., Pandit., 2004. *A review of impertave technologies for wastewater treatment I: oxidation technologies at ambient conditions*, Adv. Environ. Res. 8, 501-551.
- Groseclose, E. E., Ribbons, D. W. 1981. *Metabolism of resorcinylic compounds by Bacteria new pathway resorcinol catabolism in Azobacter vinelandii*, Journal of Bacteriology, 146, 460-466.
- Hsu, Y, C., Yang, H, C., Chen, J, H., 2004. *The enhancement of the biodegradability of phenolic solutions using preozonation based on high ozone utilization*. Chemosphere. 56, 149-158.
- Lepik, R., Orupõld, K., Viggor, S., Tenno, T., 2003. *Study of biodegradability of methyl- and hydroxyphenols by activated sludge*. Oil Shale. 20, 99-112.
- Marsili-Libelli, S., Tabani, F., 2002. *Accuracy analysis of a respirometer for activated sludge dynamic modelling*. Water Res. 36, 1181-1192.
- Nuhoglu, A., Yalcin, B., 2005. *Modelling of phenol removal in a batch reactor*, Proc. Biochem. 40, 1233-1239.
- Orupõld, K., Hellat, K., Tenno, T., 1999. *Estimation of treatability of different industrial wastewaters by activated sludge oxygen uptake measurements*. Wat, Sci. Tech. 40, 31-36.
- Orupõld, K., Maširin, A., Tenno, T., 2001. *Estimation of biodegradation parameters of phenolic compounds on activated sludge by respirometry*. Chemosphere. 44, 1273-1280.
- Riccio, G., Tomei, M, C., Ramadori, R., Laera, G., 2004. *Toxicity assessment of common xenobiotic compounds on municipal activated sludge: comparision between respirometry and Microtox*. Water Research. 38, 2103-2110.
- Ros, *Respirometry of Activated sludge*, Technomic Publishing Co., Inc., Basilea, Switzeland, 1993.
- Santos, A., Yustos, P., García-Ochoa, F., 2004. *Evolution of toxicity upon wet catalytic oxidation of phenol*. Environ. Sci. technol. 38,133-138.
- Suárez-Ojeda, M. E., Guisasaola, A., Baeza, J. A., 2007. *Integrated catalytic wet air oxidation and aerobic biological treatment in a municipal WWTP of a high-strength o-cresol wastewater*. Chemosphere. 66, 2096-2105 .
- USEPA. 2000. *Toxicological Review. Phenol*. CAS No. 108-95-2, US. Enviromental Protection Agency, Washington, DC.
- Vanrolleghem, P. A., 2002. *Principles of respirometry in activated sludge wastewater treatment*. Proceedings International Workshop on Recent Development in Respirometry for Wastewater Treatment Plant Monitoring and Control. Taiwan: Taipei. P. 2/1-20
- Watanabe, K., Hino, S., Onodera, K., Schin-Ichi, K., Takahashi, N., 1996. *Diversity kinetics of bacterial phenol-oxygenating activity*, J. Ferment. Bioeng. 81, 560-563.