

## BIODEGRADACIÓN DE FENOL Y FACTIBILIDAD DE PRODUCCIÓN DE POLIHIDROXIALCANOATOS EN UN SBR GRANULAR AERÓBICO

Berretta Invernizzi, Georgina<sup>a,b</sup>, Zaritzky, Noemí<sup>a,b</sup>, Ferro Orozco Micaela<sup>c</sup> y Caravelli, Alejandro<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA). Calle 47 esquina 116, La Plata, 1900 Argentina. [georginab90@gmail.com](mailto:georginab90@gmail.com)

<sup>b</sup> Depto. de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, UNLP.

<sup>c</sup> Instituto de Investigaciones en Ciencia y Tecnología de Materiales (INTEMA). Av. Colón 10850, Mar del Plata, 7606, Argentina

### INTRODUCCIÓN

La contaminación del agua se debe a la presencia de componentes o factores químicos, físicos o biológicos que deterioran su calidad<sup>1</sup>. La descarga sin tratamiento previo de efluentes líquidos de origen doméstico, hospitalarios e industriales es una de las causas principales de la contaminación de los cuerpos de agua<sup>1</sup>. Los procesos industriales generan una amplia variedad de residuos que impactan negativamente sobre los ecosistemas y la salud humana debido a su toxicidad y/o propiedades cancerígenas y mutagénicas<sup>2</sup>.

Los compuestos fenólicos constituyen uno de los principales componentes orgánicos de efluentes provenientes de petroquímicas, refinerías, papeleras y la producción de herbicidas, entre otros<sup>3</sup>. Debido a su alta toxicidad y persistencia en el ambiente estos compuestos han sido incluidos por la UE y EPA en sus listas de contaminantes prioritarios<sup>3</sup>. Los tratamientos biológicos son los más comúnmente aplicados para la remoción de estos compuestos, ya que son métodos económicos que permiten la mineralización completa<sup>4</sup>. Si bien el fenol puede ser utilizado por los microorganismos para sustentar su crecimiento, elevadas concentraciones pueden ser inhibitorias para el proceso de biodegradación. Para enfrentar esta problemática, se han propuesto técnicas de inmovilización de la biomasa, siendo la tecnología de lodos granulares una opción promisoría<sup>4</sup>.

Los biogránulos presentan una estructura densa y compacta que funciona como barrera para la difusión de compuestos tóxicos, disminuyendo la inhibición sobre la biomasa y aumentando la capacidad de remoción de los contaminantes<sup>5</sup>. El cultivo de lodos activados en reactores discontinuos secuenciales (SBR) operados con régimen de disponibilidad de carbono e inanición (“*feast*”/“*famine*”) bajo condiciones aeróbicas y alta fuerza de corte, suministrada por un elevado caudal de aire en un reactor tipo cilíndrico con alta relación altura/diámetro (A/D), permiten la formación de gránulos<sup>6</sup>. La alternancia en la disponibilidad de carbono favorece el almacenamiento de polímeros de reserva como glucógeno y polihidroxicanoatos (PHAs) durante el período “*feast*”<sup>7</sup>.

En los últimos años ha crecido el interés en revalorizar los efluentes a través de la generación de productos con valor agregado, como los PHA, un grupo de poliésteres biodegradables con características similares a los plásticos de origen petroquímico<sup>8</sup>. La producción de PHA a partir de efluentes ricos en carbono orgánico presenta una gran relevancia económica y ambiental. Diferentes efluentes pueden utilizarse para favorecer la acumulación de PHA<sup>7</sup>; no obstante, el uso de compuestos tóxicos como fenol ha sido poco evaluado<sup>9</sup>.

En el presente trabajo se propone estudiar un sistema de biogránulos aeróbicos cultivados en reactor discontinuo secuencial (SBR), evaluar su eficiencia para remover fenol y comparar la capacidad de acumulación de sustancias de reservas (glucógeno y PHAs).

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Reactor granular.** Consistió en una columna de burbujeo con volumen total de 9.5 L, con una relación A/D de 9.2. El volumen de trabajo fue de 4.6 L y el aire se suministró mediante tres aireadores con difusores ubicados en el fondo del reactor para generar un flujo hidráulico de tipo helicoidal que favorece la granulación.

**Medio de cultivo.** Se utilizó un efluente sintético conteniendo acetato de sodio ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ) y/o fenol ( $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}$ ) como fuente de carbono y energía (FCE), sulfato de amonio ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) como fuente de nitrógeno, dos sales de fosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) como fuente de fósforo y soluciones de micronutrientes<sup>10</sup>. Se mantuvo una relación DQO:N:P constante de 100:5:2.

**Operación SBR.** El reactor se inoculó con lodos activados provenientes de un SBR alimentado con fuente de carbono mixta acetato-fenol, aplicando un régimen de alimentación dinámica aeróbica en dos fases: una fase “*feast*” con disponibilidad de carbono y una fase “*famine*” o de inanición en la cual el sustrato externo ya no está disponible. Los ciclos operativos fueron de 24 hs (2 min alimentación del efluente sintético, 1425-1430 min reacción, 1 min purga de biomasa, 5-10 min sedimentación y 2 min extracción del sobrenadante) con tiempo de residencia celular (TRC) de 10 días, un tiempo de residencia hidráulico (TRH) de 2,79 días y una velocidad de aire superficial ascendente de 1,9 cm/s. El reactor se operó en 5 condiciones diferentes (Tabla 1): Aclimatación a las condiciones operativas, carga baja de fenol (BF), carga media-baja de fenol (MBF), carga media-alta de fenol (MAF) y carga alta de fenol (AF).

**Métodos analíticos y técnicas microscópicas.** Se monitoreó el reactor mediante los siguientes parámetros a lo largo de los ciclos: demanda química de oxígeno soluble ( $\text{DQO}_s$ , concentración de sustrato orgánico) y total ( $\text{DQO}_T$ , a partir del licor de mezcla), concentración de fenol por método colorimétrico<sup>11</sup>, observación microscópica de la biomasa y detección de PHA mediante tinción con colorante lipofílico Sudan Black<sup>8</sup>, concentración de amonio, nitrito y nitrato, concentración de biomasa como sólidos totales (ST), propiedades de sedimentación mediante el índice de sedimentabilidad volumétrica (ISV), concentración de carbohidratos totales (CT) siguiendo una modificación de la técnica de Antrona<sup>12</sup> y producción de PHA mediante extracción con cloroformo y cuantificación colorimétrica<sup>13</sup>.

**Parámetros cinéticos.** Se determinaron las velocidades volumétricas de consumo de sustrato orgánico ( $r_s$ ,  $\text{mgO}_2/\text{L.h}$ ) y fenol ( $r_{\text{fenol}}$ ,  $\text{mg}/\text{L.h}$ ), y de producción de glucógeno ( $r_{\text{Glu}}$ ,  $\text{mg}/\text{L.h}$ ) y PHA ( $r_{\text{PHA}}$ ,  $\text{mg}/\text{L.h}$ ) a partir de la pendiente de las curvas de decaimiento/generación en un intervalo de tiempo determinado. Por otra parte, el consumo de oxígeno se determinó a partir de la pendiente de la curva de decaimiento del  $\text{DQO}_T$  ( $r_{\text{O}_2}$ ,  $\text{mgO}_2/\text{L.h}$ )<sup>14</sup>. Asimismo, se calcularon las velocidades específicas de consumo ( $q_{\text{fenol}}$ ,  $\text{mg}/\text{gST.h}$ ,  $q_s$ ,  $\text{mgO}_2/\text{gST.h}$ ) a partir del cociente entre las velocidades volumétricas y la concentración de biomasa (ST, g/L).

**Coefficientes estequiométricos.** Se llevó a cabo un balance de masa para el período “*feast*” (en unidades de DQO), teniendo en cuenta que la FCE se destina a diferentes procesos del metabolismo celular: producción de glucógeno y PHA, fosforilación oxidativa para la generación de ATP y asimilación para la síntesis de biomasa:

$$r_s = r_x + r_{\text{PHA}} + r_{\text{Glu}} + r_{\text{O}_2} \quad (1)$$

$$\frac{r_s}{r_s} = \frac{r_x}{r_s} + \frac{r_{\text{PHA}}}{r_s} + \frac{r_{\text{Glu}}}{r_s} + \frac{r_{\text{O}_2}}{r_s} \quad (2)$$

$$1 = Y_{x/s} + Y_{\text{PHA}/s} + Y_{\text{Glu}/s} + Y_{\text{O}_2/s} \quad (3)$$

$$Y_{x/s} = 1 - (Y_{PHA/s} + Y_{GLU/s} + Y_{O_2/s}) \quad (4)$$

Para los cálculos se utilizaron las velocidades de consumo de carbono orgánico externo ( $r_s$ ), la velocidad de consumo de oxígeno ( $r_{O_2}$ ) y la velocidad de producción de glucógeno ( $r_{GLU}$ ) y PHA ( $r_{PHA}$ ), expresadas en unidades de DQO (mg O<sub>2</sub>/L.h). Para conocer cuál era la principal reserva de carbono intracelular sintetizada se calcularon los rendimientos de producción de glucógeno y PHA en función de la remoción de DQO<sub>s</sub> ( $Y_{GLU/s}$ ;  $Y_{PHA/s}$ ) y el coeficiente de oxidación del sustrato ( $Y_{O_2/s}$ ). El rendimiento de la producción de biomasa ( $Y_{x/s}$ ) se determinó según la ecuación 4,

**Tabla 1.** Condiciones de operación SBR

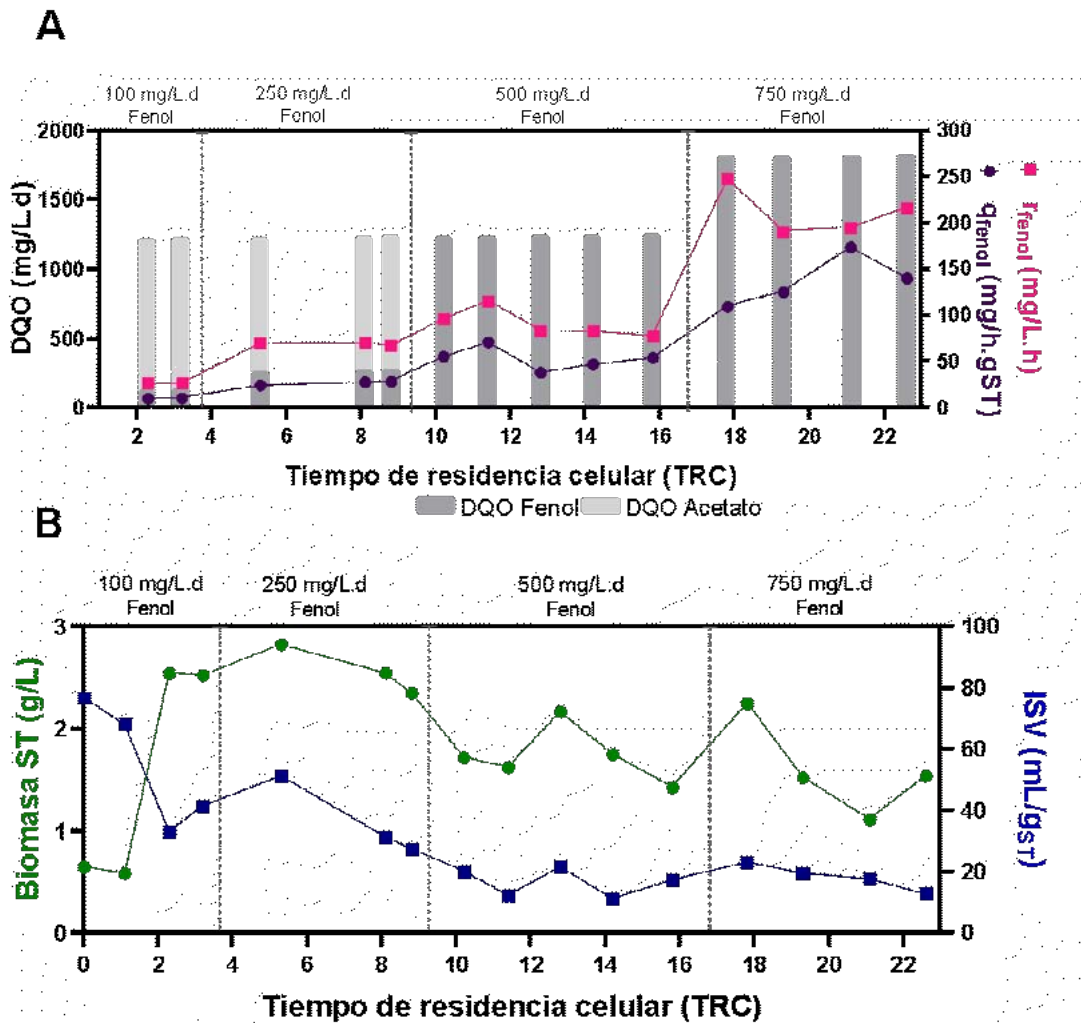
Condición	DQO (mg/L.d)	Fenol (mg/L.d)	Acetato (mg/L.d)	Fenol: Acetato (DQO:DQO)	Sedimentación (min)
Aclimatación	600	100	470	1:1,5	10
BF	1200	100	1255	1:4	5-10
MBF	1200	250	790	1:1	5
MAF	1200	500	0	1:0	5
AF	1800	750	0	1:0	5

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

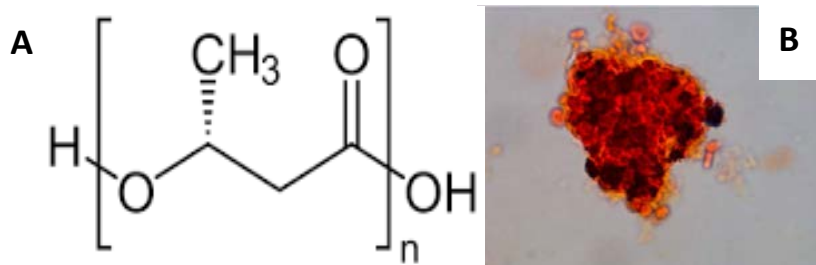
*Aclimatación y granulación.* En el período de aclimatación se observó aumento de la concentración de biomasa, con dominio de flóculos de estructura abierta, y algunos agregados más compactos con morfología granular. Luego, en la condición BF se redujo el tiempo de sedimentación a la mitad, logrando el lavado de biomasa floculenta y de crecimiento disperso al mismo tiempo que favoreció la selección de agregados microbianos de sedimentación rápida, con menor ISV (ISV < 90 mL/g)

*Selección de microorganismos y velocidad de remoción de fenol.* El aumento de la carga de fenol se realizó con el fin de seleccionar microorganismos capaces de degradar fenol, lo cual se tradujo en un aumento de la capacidad de remoción volumétrica y específica de fenol ( $r_{fenol}$  y  $q_{fenol}$ ) (Figura 1 A y B). Para todas las condiciones se observó una remoción completa del fenol, transcurrido menos del 25% del ciclo de operación.

*Acumulación de PHA como sustancias de reserva.* Durante el período *feast*, los microorganismos acumulan reservas intracelulares a partir de las FCE exógenas que son consumidas durante el período de inanición. En particular, la degradación de fenol conduce a la formación de precursores de la síntesis de PHA<sup>15</sup>. Mediante la tinción con Sudan Black se detectó la presencia de gránulos intracelulares de PHA al finalizar el período *feast* (Figura 2). La extracción y cuantificación de PHA permitió el cálculo de los parámetros cinéticos y estequiométricos. Además, se determinó que el polímero de PHA extraído poseía una pureza del 95,6% ± 0,6%



**Figura 1. A.** Velocidad de consumo de fenol y velocidad específica de consumo de fenol en función de la carga diaria de DQO y la proporción de cada FCE en función de TRC **B.** Concentración de la biomasa e índice volumétrico de lodos (ISV) en función de TRC (1 TRC=10 días).



**Figura 2. A.** Formula del PHA **B.** Imagen obtenida mediante microscopía óptica de tinción con Sudan Black del lodo granular en la condición AF. Aumento 100x

En la Tabla 2 se detallan los coeficientes estequiométricos calculados para las condiciones MAF y AF, con fenol como única fuente de carbono y energía. El incremento de la carga de fenol se correlacionó con un aumento de la velocidad de producción de PHA y un mayor rendimiento de producción de PHA en función del

sustrato consumido. Además, en la concentración más elevada no se detectó generación de glucógeno.

**Tabla 2.** Velocidades volumétricas y rendimientos

Condición	$rs^*$	$rO_2^*$	$rGlu^*$	$rPHA^*$	$Y_{O_2/S}$	$Y_{Glu/S}$	$Y_{PHA/S}$	$Y_{X/S}$
<b>MAF</b>	167,9 ± 0,9	108,1 ± 22,2	32,0 ± 0,0	22,65 ± 4,6	0,60 ± 0,01	0,19 ± 0,00	0,13 ± 0,01	0,03 ± 0,02
<b>AF</b>	449,1 ± 17,9	324,8 ± 25,1	0,0	82,1 ± 12,8	0,72 ± 0,03	0,0	0,18 ± 0,05	0,09 ± 0,03

\*Todas las velocidades volumétricas se expresaron en: mg O<sub>2</sub>/L.h.

## CONCLUSIONES

En el presente trabajo se logró obtener biogránulos con buenas propiedades de sedimentación (ISV < 90 mL/g). en las condiciones operativas estudiadas (TRC= 10 días, TRH= 2,79 días, caudal de aire sup. ascendente= 1,9 cm/s). Tras los períodos de alimentación con FCE mixta (acetato-fenol), y cargas baja y media baja de fenol (100 mg/L.d y 250/mg/L.d respectivamente), se consiguió operar el sistema con fenol como única FCE, aplicando cargas de 500 y 750 mg/L.d. En todas las condiciones se obtuvo remoción completa de fenol, observándose un aumento en la capacidad volumétrica y específica de remoción a mayores cargas de fenol. La presencia de gránulos intracelulares de PHA se detectó mediante tinción y observación microscópica. Su extracción y cuantificación permitió determinar la velocidad de generación y rendimiento en función del sustrato consumido, durante el período “*feast*”. Cabe destacar que en la condición AF (750 mg/L) no se observó la generación de glucógeno como sustancia de reserva, lo que sugiere que el PHA se convirtió en la principal sustancia de reserva en el sistema con un rendimiento de 0,18 ± 0,05 (mgO<sub>2</sub>/L.h / mgO<sub>2</sub>/L.h).

## BIBLIOGRAFÍA

- Schweitzer, L. & Noblet, J. Water Contamination and Pollution. *Green chemistry* (pp. 261-290). Elsevier (2018)
- Busca, G., Berardinelli, S., Resini, C. & Arrighi, L. Technologies for the removal of phenol from fluid streams : A short review of recent developments. *Journal of hazardous materials* **160**, 265–288 (2008).
- Santana, C. M., Ferrera, Z. S., Padrón, M. E. T., Juan, J. & Rodríguez, S. Methodologies for the Extraction of Phenolic Compounds from Environmental Samples: New Approaches. *Molecules* **14** 298–320 (2009)
- Jiang, H., Tay, J., Maszenan, A. M., Tay, S. T. & Icrobiol, A. P. P. L. E. N. M. Bacterial Diversity and Function of Aerobic Granules Engineered in a Sequencing Batch Reactor for Phenol Degradation. *Applied and Environmental Microbiology* **70**, 6767–6775 (2004).
- Maszenan, A. M., Liu, Y. & Jern, W. Bioremediation of wastewaters with recalcitrant organic compounds and metals by aerobic granules. *Biotechnology Advances* **29**, 111–123 (2011).
- Zhang, Q., Hu, J. & Lee, D. Bioresource Technology Aerobic granular processes : Current research trends. *Bioresource Technology* **210**, 74–80 (2016).

7. Carta, F., Beun, J. J., Loosdrecht, M. C. M. V. A. N. & Heijnen, J. J. Simultaneous storage and degradation of PHB and glycogen in activated sludge cultures. *Water Research* **35**, 2693–2701 (2001).
8. Serafim, L. S. & Lemos, P. C. Strategies for PHA production by mixed cultures and renewable waste materials. *Applied microbiology and biotechnology* **81** 615–628 (2008).
9. Anjum, A. *et al.* International Journal of Biological Macromolecules Microbial production of polyhydroxyalkanoates ( PHAs ) and its copolymers : A review of recent advancements. *International Journal of Biological Macromolecules* **89**, 161–174 (2016).
10. Beun, J. J. *et al.* Aerobic granulation in a sequencing batch reactor. *Water Research* **33**, 2283–2290 (1999).
11. Jones, P., Johnson, K. Estimation of Phenols by the 4-Aminoantipyrine Method. II. Products from para-Substituted Alkylphenols. *Canadian Journal of Chemistry* **51.22** 3733-3737 (1973).
12. Jenkins, K., Richard, M. G. & Daigger, G. T. *Manual on the Causes and Control of Activated Sludge Bulking and Foaming*. (Lewis Publishers, 1993).
13. Reddy, M. Venkateswar, *et al.* Pseudomonas otitidis as a potential biocatalyst for polyhydroxyalkanoates (PHA) synthesis using synthetic wastewater and acidogenic effluents. *Bioresource technology* **123** 471-479 (2012).
14. Contreras, E., Menes, R. Caracterização, Monitoramento e Controle de Processos. Técnicas de Medida de Actividad, en libro *Tratamiento de Águas Residuárias*. (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, 2007).
15. Yang, M. *et al.* Journal of Environmental Chemical Engineering Synthesis of intracellular polyhydroxyalkanoates (PHA) from mixed phenolic substrates in an acclimated consortium and the mechanisms of toxicity. *Journal of Environmental Chemical Engineering* **10**, 107944 (2022).