

Influencia de la historia nutricional de barros activados en la aclimatación y degradación de Bisfenol A

A.M. Ferro Orozco^a, E.M. Contreras^a, N.E. Zaritzky^{bc}

^aInstituto de Investigaciones en Ciencia y Tecnología de Materiales (INTEMA). Fac. de Ing., UNMdP.

^bCentro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos, CIDCA (UNLP-CONICET-CIC).

^cFac. de Ingeniería, UNLP.

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

Resumen

Aunque el bisfenol A (BFA) ha sido descrito 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). Generalmente las plantas de tratamiento de aguas residuales industriales reciben efluentes compuestos por una mezcla de xenobióticos y sustratos fácilmente biodegradables (biogénicos) en diferentes proporciones. La presencia de diferentes sustratos de fácil degradación tendrá también como resultado el cambio en la composición de la comunidad microbiana y por lo tanto en las posibilidades de degradación de un determinado compuesto xenobiótico. En este contexto, la degradación de xenobióticos podría ser modificada dependiendo de la historia nutricional previa de la biomasa, ya que tanto su actividad metabólica como la diversidad de los grupos microbianos podría variar.

El objetivo del presente trabajo fue analizar la influencia de la historia nutricional previa de un cultivo de barros activados sobre la aclimatación y posterior degradación de bisfenol A en reactores semicontinuos. Se utilizaron barros activados con historia nutricional previa a base de glucosa (Reactor G), acetato (Reactor A) o peptona (Reactor P). El desempeño de los reactores, en presencia o ausencia de BFA, fue evaluado en cada ciclo de operación en términos de consumo de bisfenol A, carbono orgánico en solución (COS) y crecimiento de la biomasa. Asimismo, la actividad metabólica fue monitoreada mediante la utilización de una técnica respirométrica. A partir de los resultados se obtuvieron los valores de los coeficientes cinéticos correspondientes, velocidad específica de consumo de BFA (q_{BFA} , mgBFA gSST⁻¹ d⁻¹), velocidad específica de consumo de sustrato (q_{S} , mgCOS gSST⁻¹ h⁻¹), y velocidad específica de consumo de oxígeno (q_{O_2} , mgO₂ gSST⁻¹ h⁻¹). Considerando la aclimatación y la degradación de BFA, los resultados mostraron grandes diferencias en el comportamiento de las comunidades microbianas generadas a partir de diferente historia nutricional. Los valores de q_{BFA} fueron de 21.4 ± 2.6 , 12.0 ± 7.0 , y 42.0 ± 7.4 mgBFA gSST⁻¹ d⁻¹, para los reactores G, A, y P, respectivamente. Los resultados indican que, debido a su alta actividad específica de remoción de BFA, los barros activados que han crecido en un medio rico en proteínas serían más adecuados para el tratamiento de aguas residuales contaminadas con dicho xenobiótico.

Palabras claves: historia nutricional, bisfenol A, sustratos biogénicos, barros activados

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. Este compuesto es levemente tóxico para peces e invertebrados, y ha sido descrito como moderadamente estrogénico¹. Sin embargo, como resultado de su amplio uso ha sido detectado frecuentemente tanto en aguas residuales municipales como industriales. Los compuestos xenobióticos, tales como el BFA, se encuentran presentes en las aguas residuales conjuntamente con sustratos fácilmente biodegradables (biogénicos) en diferentes proporciones. La presencia de diferentes sustratos de fácil degradación tendrá también como resultado el cambio en la composición de la comunidad microbiana y así, en sus posibilidades de degradación de un determinado compuesto xenobiótico. En este contexto, la degradación de xenobióticos podría ser modificada dependiendo de la historia nutricional previa de la biomasa, ya que tanto la actividad metabólica como los grupos microbianos podrían variar. En este sentido, el objetivo del presente trabajo fue analizar el efecto de la historia nutricional previa de un cultivo de barros activados sobre la aclimatación y posterior degradación de bisfenol A en reactores semicontinuos.

Materiales y métodos

Reactores parentales semicontinuos. Se utilizaron tres reactores semicontinuos de barros activados que se diferenciaban según el sustrato biogénico utilizado para su alimentación en cada ciclo de operación: Reactor G (alimentado con Glucosa), Reactor A (alimentado con Acetato), Reactor P (alimentado con Peptona). Las concentraciones de glucosa, acetato y peptona fueron de 500 mgDQO L⁻¹ en cada ciclo. Los reactores fueron operados de la siguiente manera. En el primer ciclo cada reactor se cargó con un efluente sintético conteniendo el sustrato correspondiente (G: glucosa, A: acetato, P: peptona), (NH₄)₂SO₄ 1g L⁻¹, K₂HPO₄ 2g L⁻¹, y KH₂PO₄ 0.6 g L⁻¹. Se adicionaron además soluciones de micronutrientes. En los ciclos sucesivos, se adicionó el sustrato correspondiente. Se agregó (NH₄)₂SO₄ cuando la concentración de nitrógeno amoniacal total (NAT) disminuía por debajo de los 40 mgN L⁻¹. En cada ciclo se determinaron las concentraciones de carbono orgánico soluble (COS), NAT y biomasa en función del tiempo. Los reactores fueron operados durante dos tiempos de residencia celular de 33 d; al cabo de los mismos, los reactores parentales G, A y P fueron divididos en dos reactores. Los reactores resultantes continuaron operándose de la misma manera que los reactores G, A y P y fueron alimentados de la siguiente manera:

G1: alimentado con glucosa en cada ciclo de operación

G2: alimentado con glucosa y BFA en cada ciclo de operación

A1: alimentado con acetato en cada ciclo de operación

A2: alimentado con acetato y BFA en cada ciclo de operación

P1: alimentado con peptona en cada ciclo de operación

P2: alimentado con peptona y BFA en cada ciclo de operación

Las concentraciones de BFA y sustratos biogénicos (glucosa, acetato y peptona) fueron de 40 mg L⁻¹ y 500 mgDQO L⁻¹, respectivamente. En cada ciclo de operación se obtuvo el valor de la velocidad de consumo de sustrato (R_s , mgCOS L⁻¹ h⁻¹) como la pendiente de la recta obtenida al graficar la concentración de COS en función del tiempo, y la velocidad de consumo de BFA (R_{BFA} , mgBFA L⁻¹ h⁻¹) como la pendiente de la recta obtenida al graficar la concentración de BFA en función del tiempo. Con el objeto de

poder realizar comparaciones, se obtuvieron las velocidades específicas de consumo de S y BFA (q_S , mgCOS gSST⁻¹ h⁻¹ y q_{BFA} , mgBFA gSST⁻¹ h⁻¹) para cada ciclo como:

$$q = \frac{R}{X_o} \quad (1)$$

donde q es la velocidad específica de consumo de S o BFA, R es la velocidad de consumo de S o BFA, y X_o corresponde a la concentración de biomasa en cada ciclo de operación.

Ensayos respirométricos. Se utilizó un respirómetro abierto compuesto por un reactor cilíndrico (700ml), 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., Ohio, USA) conectado a una PC que permitía la adquisición de un dato/5 segundos. El experimento consistía en colocar en el respirómetro la biomasa proveniente de cada uno de los reactores. Luego se agregaba el sustrato correspondiente y se registraba la concentración de oxígeno disuelto (C) en función del tiempo (t). A partir del balance de masa para el OD se calculó la velocidad de respiración total (R_T , mgO₂ L⁻¹ h⁻¹) mediante la siguiente expresión:

$$R_T = K_L a (C_S - C) - \frac{dC}{dt} \quad (2)$$

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 R_T puede ser dividida en una velocidad de respiración endógena (R_{En}) y una exógena (R_{Ex}). Cuando no hay sustrato oxidable, los microorganismos oxidan su propia biomasa con el objeto de generar energía para las funciones de mantenimiento celular (R_{En}). Al agregar un sustrato (S) 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) durante la oxidación de S se calculó como:

$$OC = \int (R_T - R_{En}) dt = \int R_{Ex} dt \quad (3)$$

A partir de este valor se calculó el coeficiente de oxidación del sustrato ($Y_{O/S}$) como el cociente entre OC y la concentración inicial de S (glucosa, acetato o peptona).

Para realizar comparaciones entre experimentos con diferentes concentraciones de biomasa, se calculó la velocidad específica de consumo de oxígeno (q_{O_2} , mgO₂ gSST⁻¹ h⁻¹) como la relación entre R_{Ex} y la concentración de biomasa en el respirómetro.

Técnicas analíticas. La concentración de BFA se determinó mediante el método de la 4-aminoantipirina (4-AAP). La concentración de biomasa fue medida como sólidos suspendidos totales (SST). La concentración de carbono orgánico soluble (COS) se determinó utilizando un equipo Shimadzu (TOC-Vcpn analyzer). La concentración de NAT se midió utilizando reactivos comerciales (Hach Company, Loveland, CO).

Resultados y discusión

La Figura 1 muestra los cambios en las concentraciones de COS, biomasa, NAT y BFA en función del tiempo para cada ciclo de operación de los reactores G1

(glucosa), G2 (glucosa + BFA), A1 (acetato), A2 (acetato + BFA), P1 (peptona), P2 (peptona + BFA). La Figura 2 muestra un ejemplo correspondiente a la velocidad de consumo de oxígeno (R) en función del tiempo para cada uno de los reactores en estudio. Se observa inserta en la Figura 2, la evolución de la concentración de COS en función del tiempo.

Los reactores G1 y G2 tuvieron un desempeño muy similar. Tanto el consumo de COS en cada ciclo, como el crecimiento de la biomasa fueron similares para ambos reactores (Fig.1 a,g). El rendimiento en biomasa ($Y_{X/S}$) fue similar para ambos reactores (Tabla 1). Los valores de q_S (ec.1) y q_{O_2max} no presentaron diferencias significativas (t-test) (Tabla1). Debido a la variabilidad que presentan los valores de q_{O_2max} , se calculó el valor de q_S a partir de los perfiles respirométricos (q_{Sres}) como la relación entre S_0 (concentración inicial de sustrato) y el tiempo de degradación total $(\Delta t)^2$. En este sentido, fue necesario considerar la forma y las fases observadas en los perfiles respirométricos.

En la Figura 2 puede observarse que los perfiles respirométricos correspondientes a los reactores G1, G2, A1 y A2 mostraron dos fases diferentes y bien definidas. Dichas fases coinciden con aquellas informadas por otros autores³ cuando se produce un proceso de acumulación de polímeros de reserva. En la fase (I) los valores de R aumentan rápidamente hasta un máximo, siendo coincidente con el agotamiento del COS externo (figuras insertas en la Figura 2). La fase (II) comprende el período de tiempo en el cual los valores de R descienden desde el máximo alcanzado en la fase (I) hasta alcanzar gradualmente el valor de la respiración endógena. Esta segunda fase es presumiblemente causada por la utilización del sustrato secundario, como polímeros de almacenamiento (polihidroxialcanoatos (PHA) y/o glucógeno) producidos a partir del sustrato añadido en la fase (I).

Para calcular los valores de q_{Sres} se utilizó el tiempo de degradación total que comprende la fase (I) ($\Delta t_{(I)}$), coincidente con el tiempo de agotamiento del COS (insertos en la Figura 2). Como puede observarse en la Tabla 1, los valores de q_{Sres} medios fueron mayores que los de q_S (ec.1) para G1 y G2. Esta diferencia puede deberse a la sobreestimación de $\Delta t_{(I)}$ utilizado para el cálculo de q_{Sres} , ya que ambas fases (I y II) se superponen. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en la cinética de degradación del sustrato (t-test) entre G1 y G2.

La oxidación completa de la glucosa da como resultado un valor de $Y_{O/S}$ de $6 \text{ molO}_2 \text{ molGlu}^{-1}$. En el presente trabajo, el consumo de oxígeno total promedio (OC_t) obtenido a partir de los perfiles respirométricos fue de $176.42 \pm 17.96 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$ y $238.57 \pm 25.67 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$ para G1 y G2, respectivamente. Asumiendo que se consumen

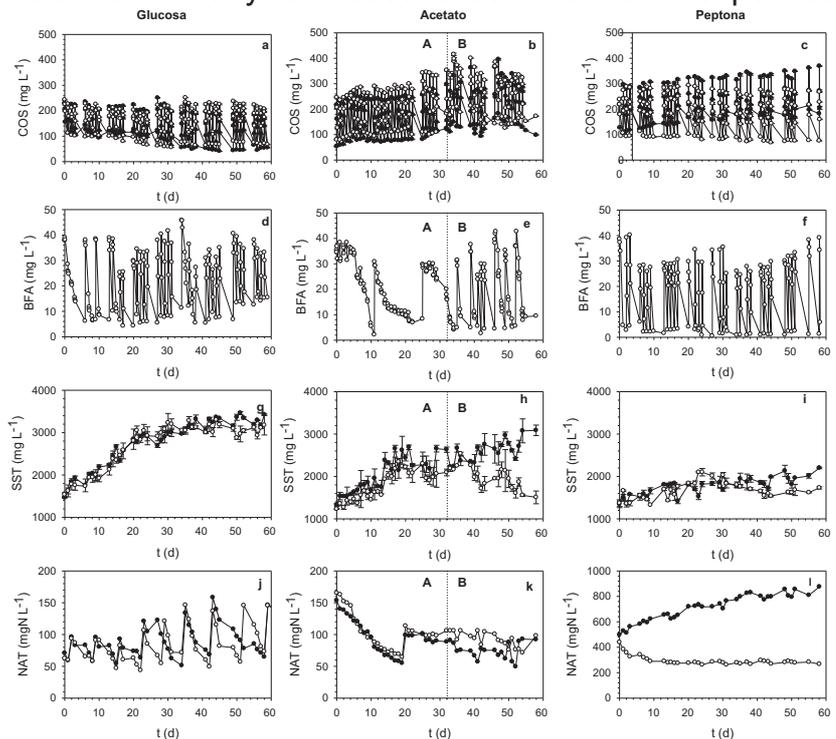


Fig.1. Evolución de la concentración de (a,b,c) COS, (d,e,f) BFA, (g,h,i) SST, (j,kl) NAT en función del tiempo correspondiente a cada ciclo de los reactores G1 (glucosa), G2 (glucosa + BFA), A1 (acetato), A2 (acetato + BFA), P1 (peptona), P2 (peptona + BFA). Los símbolos negros representan los reactores alimentados solo con sustrato biogénico. Los símbolos blancos representan los reactores alimentados con sustrato biogénico y BFA.

alrededor de $60 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$ para 40 mgBFA L^{-1} , el OC_t del reactor G2 debido al consumo de glucosa sería de $178,57 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$. Por lo tanto, el valor de $Y_{O/S}$ para los reactores G1 y G2 fue de 1,99 y 2,01 $\text{molO}_2 \text{ molGlu}^{-1}$, respectivamente, indicando que la oxidación de la glucosa fue incompleta.

En cuanto a la degradación de BFA (G2, Fig.1d) se observó un rápido proceso de aclimatación de la biomasa. El BFA adicionado en el ciclo #1 fue consumido completamente en 6 días. En los ciclos sucesivos el BFA fue consumido dentro de las 24 hs. El valor promedio de q_{BPA} se observa en la Tabla 1.

Los reactores A1 y A2 mostraron un comportamiento similar hasta el día 35 de operación (Fig.1b,h,k); luego, se observó una etapa de decaimiento celular en el reactor A2. Por tal motivo, los resultados fueron analizados considerando dos etapas en la operación de A1 y A2 (Etapas (A) y (B) en la Figura 1b,e,h,k). Durante la etapa (A) los valores de $Y_{X/S}$, q_s , $q_{\text{O}_2\text{max}}$, y q_{Sres} (Tabla 1) obtenidos para los reactores A1 y A2 no presentaron diferencias significativas (t-test). Durante la etapa (B), debido al descenso de la concentración de biomasa en el reactor A2, los valores de q_s , $q_{\text{O}_2\text{max}}$ y q_{Sres} en A2 fueron mayores a los calculados en A1, presentando diferencias significativas (t-test) (Tabla 1).

La oxidación completa de acetato da como resultado un valor de $Y_{O/S}$ de $2 \text{ molO}_2 \text{ molAce}^{-1}$. En el presente trabajo, el consumo de oxígeno total promedio (OC_t) obtenido a partir de los perfiles respirométricos fue de $226.19 \pm 20.83 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$ para A1 y de $267.68 \pm 17.43 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$ para A2. Asumiendo que se consumen alrededor de $60 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$ para 40 mgBFA L^{-1} , el OC_t del reactor A2 debido al consumo de acetato sería de $207.58 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$. Por lo tanto, el valor de $Y_{O/S}$ para los reactores A1 y A2 fue de 0.90 y 0.83 $\text{molO}_2 \text{ molAce}^{-1}$, respectivamente; tales valores de $Y_{O/S}$ indican que la oxidación del acetato fue incompleta.

La comunidad microbiana desarrollada en A2 no presentó la capacidad de degradar el BFA desde el comienzo de la operación del reactor (Fig.1e); el proceso de aclimatación se extendió durante aproximadamente 30 días. Durante este período de tiempo sólo se realizaron tres adiciones de BFA, y en cada uno de estos tres ciclos de degradación se observó una fase de latencia. El promedio obtenido para el valor de q_{BPA} se observa en la Tabla 1.

Los resultados obtenidos para los reactores P1 y P2 se observan en la Figura 1c,f,i,l. Independientemente de la presencia de BFA, el incremento en la concentración de biomasa fue muy bajo en ambos reactores (Fig.1i). Con respecto al consumo de COS, se observaron diferencias en su concentración residual al final de cada ciclo, siendo menores en el reactor P2 que en el reactor P1 (Fig.1c). Por otra parte, el reactor P1 mostró un incremento gradual de la concentración de NAT de un ciclo al siguiente (Fig.1j), alcanzando los 800 mgN L^{-1} . Lo contrario se observó en el reactor P2; la concentración de NAT presentó una disminución en los primeros ciclos, permaneciendo constante alrededor de los 300 mgN L^{-1} hasta el final del experimento (Fig.1j). Aunque ambos reactores mostraron similitudes en la evolución de la concentración de biomasa, las diferencias en la evolución de las concentraciones de

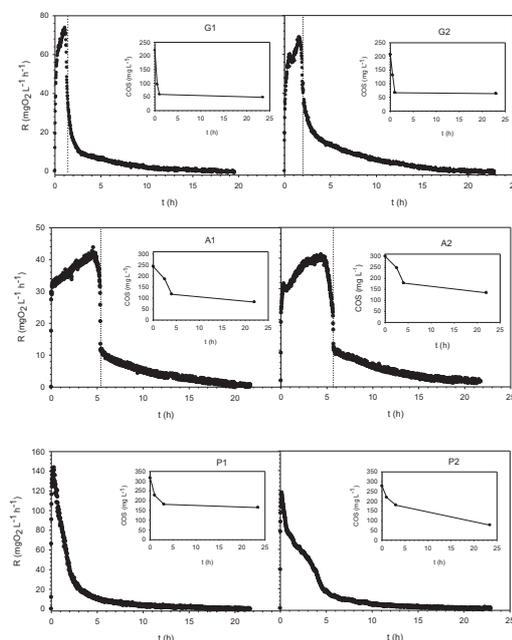


Fig. 2. Velocidad de consumo de oxígeno (R) en función del tiempo para los reactores G1 (glucosa), G2 (glucosa + BFA) A1 (acetato), A2 (acetato + BFA), P1 (peptona), P2 (peptona + BFA). Las figuras insertas corresponden al COS en función del tiempo para el ciclo analizado.

COS y NAT en los reactores P1 y P2 podrían indicar diferencias en el metabolismo de la comunidad microbiana desarrollada en ausencia y en presencia de BFA. Sin embargo, los valores de $Y_{X/S}$ para P1 y P2 fueron similares (Tabla 1). Tampoco se encontraron diferencias significativas (t-test) en los valores de q_s , q_{O2max} y q_{Sres} (Tabla 1). Los valores de $Y_{O/S}$ fueron de 0.51 y 0.57 $mgO_2 mgPeptona^{-1}$ para los reactores P1 y P2, respectivamente. Teniendo en cuenta que se consume 1 mgO_2 para oxidar completamente 1 mg de peptona, los valores de $Y_{O/S}$ obtenidos en el presente estudio indican que la peptona no fue oxidada completamente.

En el reactor P2, la degradación de BFA se observó desde el ciclo #1 sin presentar fase de latencia. El valor promedio de q_{BFA} se observa en la Tabla 1.

Tabla 1. Valores medios de $Y_{X/S}$, q_s , q_{Sres} , q_{O2max} , y q_{BFA} obtenidos en la operación de los reactores G1, G2, A1, A2, P1 y P2.

Reactor	$Y_{X/S}$	q_s	q_{Sres}	q_{O2max}	q_{BFA}
G1	0.25	21.88 ± 7.27	33.19 ± 6.51	20.12 ± 4.04	
G2	0.30	19.43 ± 7.20	34.06 ± 5.57	22.39 ± 5.23	21.36 ± 2.64
A1	0.22	(A) 13.63 ± 2.25 (B) 16.31 ± 3.03	(A) 13.09 ± 1.93 (B) 14.07 ± 1.63	(A) 21.18 ± 6.96 (B) 22.26 ± 7.23	
A2	(A) 0.25 (B) -0.24	(A) 13.47 ± 1.92 (B) 19.98 ± 4.52	(A) 16.16 ± 4.10 (B) 18.42 ± 4.53	(A) 27.28 ± 5.67 (B) 30.20 ± 8.00	12.00 ± 7.2
P1	0.17	27.42 ± 1.83	30.04 ± 2.21	51.63 ± 11.49	
P2	0.15	23.56 ± 1.70	28.44 ± 2.75	54.42 ± 11.56	42.00 ± 7.44

$Y_{X/S}$ ($mgSST mgCOS^{-1}$); q_s ($mgCOS gSST^{-1} h^{-1}$); q_{Sres} ($mgCOS gSST^{-1} h^{-1}$); q_{O2max} ($mgO_2 gSST^{-1} h^{-1}$); q_{BFA} ($mgBFA gSST^{-1} d^{-1}$).

Conclusiones

La presencia de BFA no modificó el comportamiento de los reactores semicontinuos provenientes de una historia nutricional a base de glucosa o peptona. En contraposición, los reactores alimentados a base de acetato mostraron diferencias debido a la presencia de BFA, posiblemente mediante una nueva modificación de la estructura de la comunidad microbiana luego del proceso de aclimatación al compuesto xenobiótico.

En cuanto a la degradación de BFA, los resultados indicaron que, debido a su alta actividad específica de remoción de BFA, los barros activados desarrollados en un medio rico en proteínas serían los más adecuados para el tratamiento de aguas residuales contaminadas con dicho compuesto xenobiótico.

Bibliografía

1. Kang J.H., Kondo F., Katayama Y., 2006. Human exposure to bisphenol A. *Toxicol.* 226, 79-89.
2. Lobo C.C., Bertola N.C., Contreras E.M. 2013. Stoichiometry and kinetic of the aerobic oxidation of phenolic compounds by activated sludge. *Bioresour. Technol.* 136, 58-65.
3. Orhon D., Cokgor E.U., Katipoglu T., Insel G., Karahan O., 2010. Fate of 2,6-dihydroxybenzoic acid and its inhibitory impact on the biodegradation of peptone under aerobic conditions. *Bioresour. Technol.* 101, 2665-2671.
4. Ferro Orozco, A.M., Contreras, E.M., Zaritzky, N.E., 2016. Biodegradation of bisphenol A and its metabolic intermediates by activated sludge: stoichiometry and kinetics analysis. *International Biodeterioration and Biodegradation* 106, 1-9.