

CINÉTICA DE BIODEGRADACIÓN DE UN NONILFENOL POLIETOXILADO EN AGUA DE RÍO

M.A. Manzano Quiñones, J.A. Perales Vargas-Machuca, D. Sales Márquez y J.M. Quiroga Alonso¹

RESUMEN: En el presente trabajo se aborda el estudio cinético del proceso de biodegradación de uno de los tensioactivos sintéticos más consumidos en el mundo a nivel industrial, los alquilfenoles polietoxilados (APEO), en un medio natural como es el agua de río. El método de ensayo empleado ha sido el "River die away test" y para el análisis de la materia tensioactiva se ha empleado cromatografía líquida de alta resolución.

El modelo cinético propuesto por los autores, ha sido aplicado a los datos de biodegradación obtenidos bajo diversas condiciones de temperatura y concentración inicial de materia activa. Los resultados muestran que el modelo se ajusta tanto a situaciones de periodos de inducción breves como prolongados y permite obtener parámetros cinéticos de interés como son, el contenido en substrato no biodegradable y la velocidad máxima de crecimiento microbiano.

INTRODUCCIÓN

Los alquilfenoles polietoxilados (APEO) constituyen un importante grupo de tensioactivos desde que en 1940 se sintetizaron por primera vez (Wang y Fingas, 1993). En la actualidad, son los más usados a nivel industrial y los terceros en el ranking para diferentes aplicaciones, con un volumen anual de producción de 370.000 T (Raymond, 1996).

Su resistencia a la biodegradación a bajas temperaturas y la generación, durante el proceso de degradación, de unos metabolitos persistentes y de una toxicidad muy superior a la del compuesto de partida (Schroder, 1993) ha dado lugar a que distintos países (Reino Unido, Alemania y Suiza) prohíban su utilización en formulaciones domésticas, quedando su uso restringido a las aplicaciones industriales, donde la especificidad de las propiedades requeridas hacen más difícil su sustitución.

Una de las claves para la evaluación del impacto ambiental asociado al uso de productos específicos, es la predicción de las concentraciones ambientales. Además, la identificación y caracterización de los procesos de biodegradación así como de las ecuaciones cinéticas que rigen el proceso, constituyen etapas fundamentales en el estudio del comportamiento de un contaminante en un ecosistema dado.

Pocos son los esfuerzos que han sido realizados para la obtención de las ecuaciones de velocidad que describan la biodegradación de contaminantes orgánicos xenobióticos en sistemas medioambientales, o hacia la identificación de las variables que afectan significativamente a las velocidades de biodegradación en estos sistemas, siendo precisamente esta información la que

es fundamental para poder extrapolar los datos obtenidos en laboratorio a los diferentes sistemas medioambientales.

En el presente trabajo se muestra la aplicación del modelo propuesto por Quiroga y Sales (1991) a los datos experimentales obtenidos en un ensayo de biodegradación de un nonilfenol polietoxilado en agua de río bajo diferentes condiciones de temperatura y concentración de materia tensioactiva, bajo las cuales se dan tanto cortos como prolongados periodos de inducción.

MATERIAL Y MÉTODOS

Producto ensayado

El tensioactivo utilizado en todos los experimentos, *Figura 1*, fue un nonilfenol polietoxilado, con un número medio de unidades etoxiladas de 15, conteniendo una amplia gama de oligómeros de 2 a 22 unidades etoxiladas.

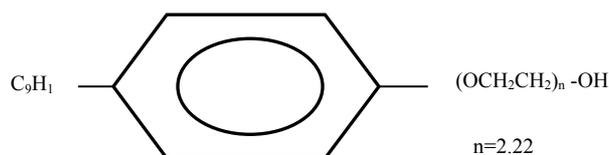


Figura 1. Estructura del Empilan NP15

Agua de río

El agua utilizada en la realización del ensayo procedía del río Guadalete, ubicado en la provincia de Cádiz, en un punto cercano a su nacimiento, para que ésta fuera lo menos antropizada posible.

¹Departamento de Ingeniería Química, Tecnología de Alimentos y Tecnologías del Medio Ambiente. Facultad de Ciencias del Mar. Universidad de Cádiz. Polígono Río San Pedro s/n. 11510 Puerto Real (Cádiz) email: manuel.manzano@uca.es

Artículo publicado en Ingeniería del Agua. Vol.5 Num.3 (septiembre 1998), páginas 27-32, recibido el 16 de enero de 1998 y aceptado para su publicación el 29 de julio de 1998. Pueden ser remitidas discusiones sobre el artículo hasta seis meses después de la publicación del mismo. En el caso de ser aceptadas, las discusiones serán publicadas conjuntamente con la respuesta de los autores en el primer número de la revista que aparezca una vez transcurrido el plazo indicado.

Las características físico-químicas más relevantes, para este tipo de estudio, del agua utilizada se presentan en la Tabla 1.

Parámetro	Valor
NO ₂ ⁻	0.57 mg/l
NO ₃ ⁻	<0.1 ppm
NH ₄ ⁺	0.15mg/l
Sólidos en suspensión	7 mg/l
SO ₄ ⁼	33.74 mg/l
pH	8.2
Conductividad	503 µS/cm
Oxidabilidad al permanganato	2 mg O ₂ /l
Microorganismos viables	84000 UFC/ml
APEO	0

Tabla 1. Características del agua utilizada en los ensayos

Ensayos de biodegradación.

El método seleccionado para realizar los estudios de biodegradación fue el Test de agua de río o "River die-away test" (Okpokwasili, 1991).

Este tipo de ensayo (aerobio, estático, y sin oxigenación inducida ni agitación mecánica) tiende a reproducir en el laboratorio la degradación de un tensioactivo en el curso de un río mediante un proceso de autodepuración natural. Ha sido utilizado por numerosos autores para estudiar la relación entre estructura molecular y biodegradación (Yoshimura, 1986; Okpokwasili, 1991), la cinética de degradación (Quiroga, 1989), los mecanismo y productos intermedios de degradación (Sivak, 1982), etc.

Los reactores en los que se realizaron los experimentos fueron de 6l de capacidad, con una superficie de contacto líquido-gas de 254 cm², y contenían 4l de agua de río, previamente decantada y recogida el mismo día que se inició el experimento. Se realizaron seis ensayos de biodegradación, de los cuales tres fueron llevados a cabo a 21°C y con concentraciones iniciales de NP15EO de 2.5, 5 y 10 mg/l, mientras que los tres ensayos restantes se realizaron con una concentración inicial de NP15EO de 5 mg/l y bajo temperaturas de 7, 13 y 25°C.

Análisis de la materia tensioactiva residual

La separación, determinación y cuantificación de los diferentes oligómeros que constituyen la mezcla comercial a estudiar se ha llevado a cabo por cromatografía líquida de alta resolución en fase normal.

El equipo utilizado fue un cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC), provisto de un inyector modelo U6K y detector de fluorescencia que operaba a 225 nm. (excitación) y 304 nm. (emisión), todo ello de la casa Waters.

El regimen de elución, Tabla 2, fue en gradiente, empleándose como eluyente A, la mezcla isopropanol/agua (95/5) y como eluyente B, hexano/isopropanol (98/2).

Tiempo (ml/min)	Flujo (ml/min)	% A	% B
0	0.6	0	100
5	0.6	0	100
20	0.6	19	81
22	0.8	21	79
70	0.8	100	0

Tabla 2. Gradiente del método cromatográfico de análisis de los alquilfenoles polietoxilados.

Como fase estacionaria se utilizó una columna Hypersil APS-2, NH₂, de tamaño de partículas 5 µm, con un diámetro interno de 4.6 mm. y una longitud de 250 mm. Esta columna analítica se empleó junto con una precolumna µmBondapak NH₂.

Las muestras tomadas de los reactores en los que se estaba llevando a cabo el proceso de biodegradación se sometían a un pretratamiento antes de inyectarlas en el cromatógrafo, consistente en llevarlas a sequedad a una temperatura de 45-55°C (a temperaturas mayores se comprobó la descomposición del tensioactivo), ayudando a la evaporación con una corriente de nitrógeno. Una vez evaporado el disolvente, se resuspende el residuo seco en 1 ml de hexano/isopropanol (80/20). El porcentaje de recuperación de este proceso de concentración, purificación y acondicionamiento fue del 94%.

La identificación se realizó a partir de la inyección de patrones internos de composición conocida, y para la cuantificación se hizo uso del concepto de igualdad de los coeficientes de absorción molar que presentan todos los oligómeros (Wang y Fingas, 1993).

Soporte informático

El registro, y posterior tratamiento de los datos en el sistema cromatográfico fue realizado por el programa de gobierno del equipo denominado "Baseline 810". Los ajustes de los datos experimentales al modelo cinético de Quiroga-Sales (Quiroga y Sales, 1991) se realizaron mediante el programa estadístico STATISTICA 4.0 producido por Statsoft Inc., 1993. Este programa se basa en el algoritmo de Marquardt de minimización de errores cuadrados para realizar las regresiones no lineales.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evolución del contenido de NPEO

En la Figura 2 se muestra la evolución del porcentaje de tensioactivo residual, durante el proceso de biodegradación.

La Figura 2a corresponde a los ensayos realizados a 21°C con concentraciones iniciales de 2.5, 5 y 10 ppm de NP15EO y la Figura 2b a los realizados con 5 ppm a 7, 13, 21 y 25°C.

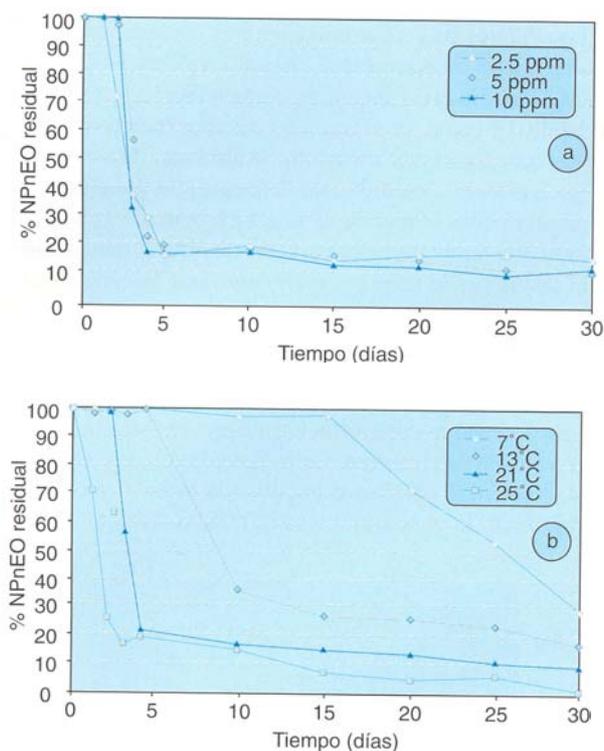


Figura 2. Evolución del porcentaje de tensioactivo residual. (a) Influencia de la concentración y (b) Influencia de la temperatura.

Del estudio de la Figura 2a se puede comprobar que ninguna de las concentraciones de trabajo ha inhibido el desarrollo microbiano, si bien se observa la existencia de una fase de aclimatación que aumenta ligeramente a medida que lo hace la concentración. Dicha fase de aclimatación dura entre 1 y 2 días en el ensayo con 2.5 ppm y entre 2 y 3 días en los ensayos con 5 y 10 ppm.

Por otra parte, en la figura 2b se observa cómo un descenso de la temperatura provoca un retraso en el comienzo del proceso, lo que muestra la gran importancia que tiene ésta en el proceso de degradación biológica de los NPEO, al afectar de forma importante a la fase de aclimatación. Así, para el ensayo a 7°C la duración de esta fase es de 15-20 días, mientras que a 13°C resulta ser de 4-10 días, disminuyendo hasta 2-3 días a 21°C y menos de un día a 25°C.

En todos los ensayos realizados a 21°C con distintas concentraciones del tensioactivo, se obtiene una biodegradación primaria, pérdida de la estructura polietoxilada,

de aproximadamente un 85%, no observándose en ninguno de los casos una eliminación completa del NP15EO como así lo evidencia el hecho de haberse detectado, tras 30 días de ensayo, productos de degradación, generados por el acortamiento de la cadena etoxilada, que son más resistentes a la biodegradación.

Por el contrario, la temperatura sí parece ejercer una notable influencia sobre la biodegradación primaria observada, siendo menor a medida que la temperatura disminuye. Así, para el ensayo a 7°C queda un 32% de tensioactivo residual, un 20% en el ensayo realizado a 13°C, un 13% en el de 21°C y un 4% en el ensayo a 25°C.

Modelo cinético

La mayoría de los autores (Larson y Payne, 1981) al estudiar la cinética de biodegradación de tensioactivos, suponen una cinética de orden uno del tipo:

$$C = C_0 \cdot e^{-kt}$$

donde C , es la concentración de sustrato que permanece en el medio, C_0 es la concentración inicial de sustrato, k es la constante de velocidad (tiempo^{-1}), y t el tiempo.

El principal problema que presenta la citada ecuación es que no contempla la existencia de un periodo o fase inicial de adaptación de los microorganismos al sustrato.

Quiroga y Sales (1991) tomando como base las modificaciones de Volterra del modelo matemático no estructurado de crecimiento bacteriano en reactores discontinuos de Pearl y Verlhust (Bayley y Ollis, 1980), y considerando las aproximaciones de Gaden (Gaden, 1959) para procesos fermentativos han propuesto un modelo cinético de degradación de tensioactivos representado por una ecuación polinómica de 2º grado del tipo:

$$-\frac{dS}{dt} = K_2 \cdot S^2 + K_1 S + K_0 \quad (1)$$

De la integración de la ecuación (1) se obtiene la siguiente relación entre la concentración de tensioactivo y el tiempo de degradación.

$$S = \frac{h \cdot (S_0 - q) - q \cdot (S_0 - h) \cdot e^{pt}}{(S_0 - q) - (S_0 - h) \cdot e^{pt}} \quad (2)$$

siendo:

$$p = \sqrt{K_1^2 - 4 \cdot K_2 \cdot K_0}$$

$$q = \frac{(-K_1 + p)}{2 \cdot K_2}$$

$$h = \frac{(-K_1 - p)}{2 \cdot K_2}$$

K_2 : coeficiente de S^2 en el polinomio de segundo grado

K_1 : coeficiente de S en el polinomio de segundo grado

K_0 : término independiente del polinomio de segundo grado

t : tiempo de degradación

S_0 : concentración inicial de tensioactivo

S : concentración de materia tensioactiva

Posteriormente, Romero (1991), llega a la misma expresión de dependencia del sustrato con el tiempo, pero partiendo de una base mecanística, obteniendo un significado físico de los valores de los parámetros p , q y h , siendo:

p : velocidad máxima específica de crecimiento de los microorganismos.

h : máxima concentración de sustrato invertible en formación de biomasa.

q : concentración de sustrato no biodegradable.

La aplicación de la ecuación (2) a los datos experimentales, permite obtener los valores de los parámetros cinéticos, así como los coeficientes de correlación para los distintos test, los cuales aparecen recogidos en la *Tabla 3*.

	Test 1	Test 2	Test 3	Test 4	Test 5	Test 6	Test 7
Conc. (ppm)	2.5	5	10	5	5	5	5
Temp. (°C)	21	21	21	7	13	21	25
h (mg/l)	2.52	5.021	10.1	5	5.11	5.02	5.18
q (mg/l)	0.47	0.856	1.53	1.6	1	0.86	0.57
p (días ⁻¹)	1.88	5.596	7.03	0.38	1.9	5.6	8.94
r ²	0.991	0.995	1	1	1	1	1

Tabla 3. Coeficientes de correlación y parámetros cinéticos obtenidos por el modelo de Quiroga - Sales.

Se observa como los coeficientes de correlación que se presentan en la *Tabla 3*, muestran valores muy próximos a la unidad, por lo que los valores teóricos predecibles con el modelo cinético propuesto por estos autores son muy próximos a los obtenidos experimentalmente en todas las condiciones de concentración y temperatura estudiadas. Este hecho es claramente visible en la *Figura 3*, donde se encuentran representados por medio de una línea continua los valores teóricos obtenidos a partir de la expresión del modelo, y por medio de círculos los valores experimentales para los diferentes test.

Se puede observar como con la aplicación del modelo cinético de Quiroga-Sales se consigue un buen ajuste, incluso en aquellos casos en los que tiene lugar prolongados periodos de inducción (Test 4 y 5), algo que no se consigue con otros modelos descritos en la bibliografía.

En cuanto a los valores de los parámetros *p*, *q* y *h* obtenidos en los diferentes test son varias las apreciaciones que se pueden realizar.

Los valores del parámetro *h* en los diferentes test son muy próximos a las concentraciones iniciales de NPEO empleadas, lo que viene a confirmar la aplicabilidad del citado modelo en las condiciones estudiadas. El hecho de que los valores del parámetro *h* sean algo superiores a la concentración inicial de sustrato puede atribuirse al significado del mismo obtenido por Romero (1991), en la que *h* viene dada por la suma de la concentración inicial de sustrato y un término de menor magnitud dado por el cociente entre la concentración inicial de biomasa y el coeficiente de rendimiento biomasa/sustrato.

Es decir, puede demostrarse que *h* tiene dimensiones de sustrato y se corresponde con la máxima cantidad de sustrato disponible en el medio para formar biomasa, ya que incluye además de *S₀*, la biomasa existente en el medio y que también puede ser metabolizada (metabolismo endógeno)

Los valores de *q*, que constituye la concentración de sustrato no biodegradable, presenta valores ascendentes a medida que aumenta la concentración, pasando a ser de 0.46 ppm en el test 1 a 1.52 ppm en el test 3. De la misma forma este parámetro va tomando valores cada vez mayores a medida que disminuye la temperatura pasando de 0.56 ppm a 25°C a 1.60 ppm a 7°C lo que indicaría aumento de los niveles de NPEO remanente al disminuir la temperatura y aumentar la concentración.

En lo que a los valores de *p* se refiere, se aprecia en la *Tabla 3*, como su valor se ve incrementado a medida que lo hace la concentración inicial de materia activa empleada en el ensayo. Considerando que *p* representa la velocidad máxima específica de crecimiento de la biomasa, lo cual está a su vez relacionado con la velocidad de degradación

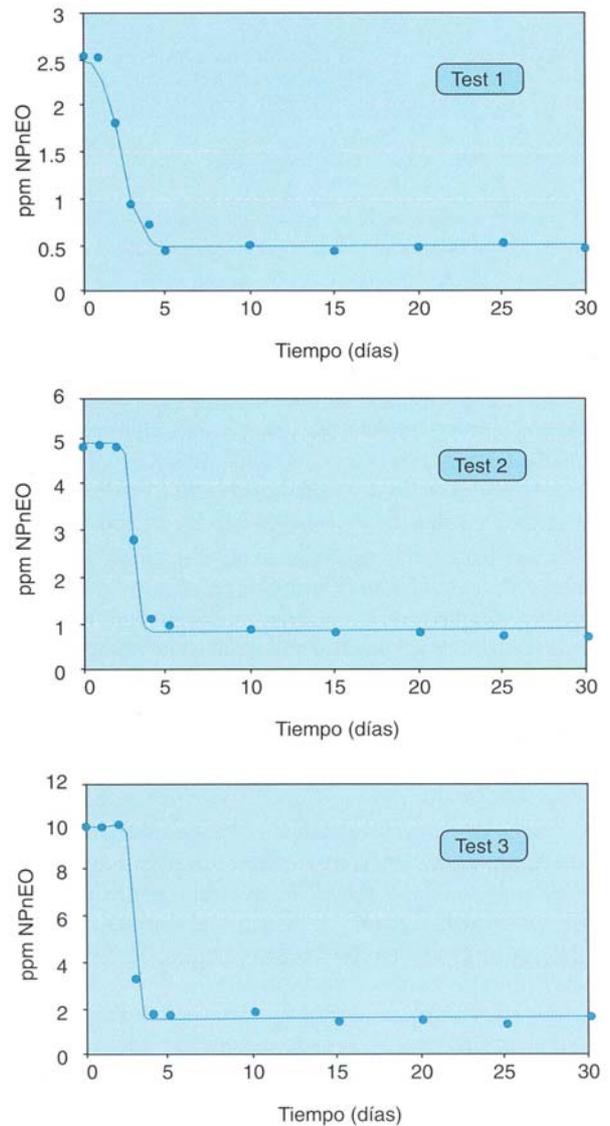


Figura 3 a. Representación de los valores experimentales y teóricos obtenidos a partir del modelo cinético de Quiroga-Sales, en los ensayos realizados a distintas concentraciones (Test 1-3).

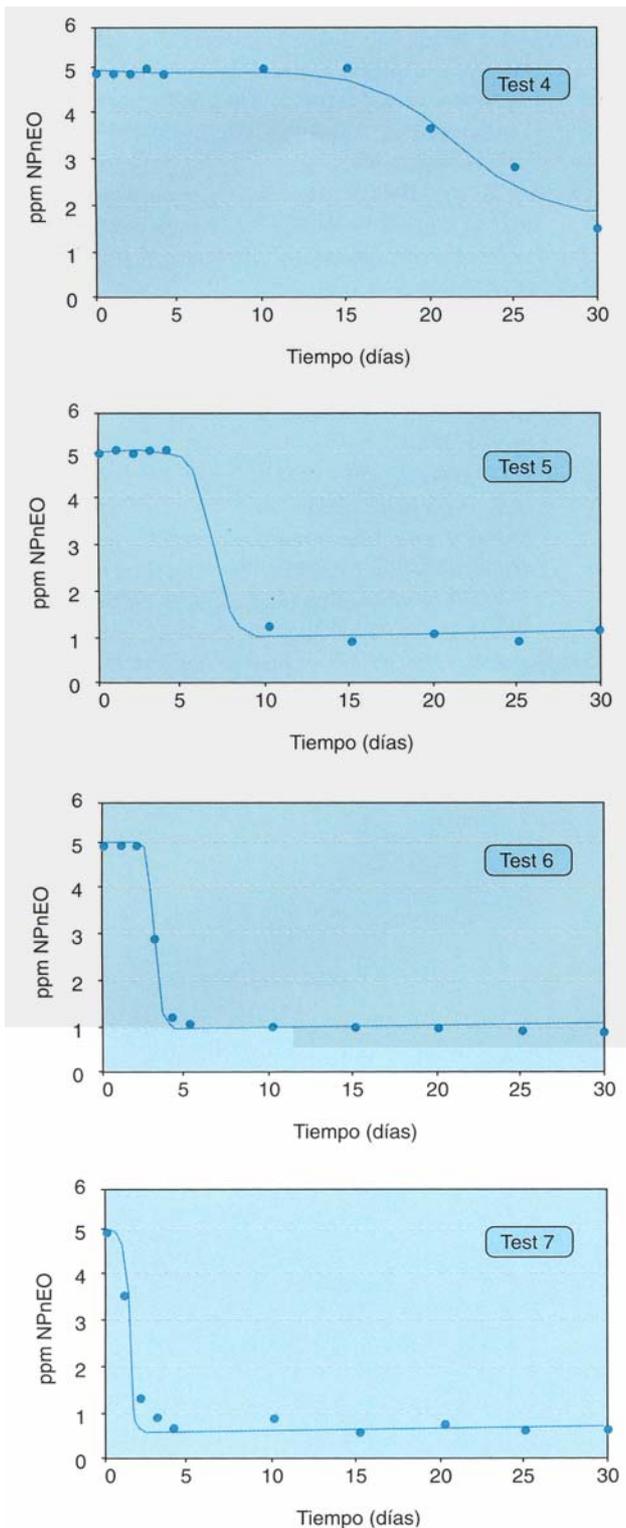


Figura 3b. Representación de los valores experimentales y teóricos obtenidos a partir del modelo cinético de Quiroga-Sales, en los ensayos realizados a distintas temperaturas (Test 4-7)

del sustrato (agente de superficie), podemos indicar que a medida que aumenta la concentración inicial de tensioactivo, aumenta su velocidad de degradación, pasando p de tener un valor de

1.876 en el test 1, el de menor concentración, a 7.03 en el test 3, el de mayor concentración. Así, el sustrato que se le adiciona al medio es utilizado tanto para aumentar el número de microorganismos (ruta anabólica) como para proporcionar la energía necesaria para las funciones metabólicas (ruta catabólica). Al aumentar la concentración de sustrato presente en el medio la proporción de éste que se utiliza en la ruta anabólica aumenta, aumentando por tanto la velocidad de crecimiento de los microorganismos.

Este mismo efecto puede observarse al aumentar la temperatura. Se obtienen valores ascendente de la velocidad específica máxima de crecimiento a medida que aumenta la temperatura; así en el ensayo realizado a 7°C, test 4, el valor del parámetro p es de 0.381, pasando a ser de 1.901 y 5.596 a 13 y 21°C respectivamente, y de 8.936 a la máxima temperatura estudiada, 25°C ya que la temperatura aumenta la velocidad de las reacciones enzimáticas de biodegradación.

CONCLUSIONES

- A medida que disminuye la temperatura, se observa un descenso de los niveles de eliminación primaria del nonilfenol polietoxilado estudiado. Así, a 25°C se alcanza una biodegradación primaria del 96%, mientras que a 21°C es del 87%, disminuyendo al 80% y al 68% en los ensayos realizados a 13 y 7°C. Por otra parte, la biodegradación primaria o pérdida de la estructura polietoxilada que caracteriza al tensioactivo analizado, nonilfenol polietoxilado, es del 85% a todas las concentraciones estudiadas a 21°C.
- La velocidad de degradación de los nonilfenoles polietoxilados aumenta a medida que se incrementa temperatura. La temperatura juega, pues, un papel primordial en su degradación, registrándose grandes aumentos en la velocidad del proceso a medida que ésta se incrementa. La velocidad de degradación de los nonilfenoles polietoxilados aumenta también a medida que se incrementa la concentración del tensioactivo estudiado.
- La temperatura influye notablemente en el periodo de aclimatación, obteniéndose valores cada vez mayores a medida que disminuye ésta. La concentración también influye, pero en menor medida, en la fase de latencia de los microorganismos
- No se ha observado, en ninguna de las condiciones ensayadas y durante el tiempo que duró el ensayo, la total eliminación o mineralización del nonilfenol polietoxilado, como se deduce de la detección de intermedios de degradación en el medio en todas las condiciones estudiadas.
- El modelo cinético propuesto por Quiroga-Sales (1991) resulta válido para predecir el comportamiento del NP15EO en agua de río bajo una gran variedad de condiciones, tanto aquellas que producen prolongados periodos de aclimatación como en aquellas situaciones en las que la biodegradación transcurre con periodos de inducción cortos.

REFERENCIAS

- Bayley, J. y Ollis, D. (1980) Biochemical Engineering Fundamentals. Ed. McGraw Hill.
- Gaden, E. (1959) *Fermentation process kinetics*. J. Biochem. Microbiol. Tech. Eng. 1. pp 63-70
- Larson, R. y Payne, A. (1981) *Fate of the benzene ring of linear alkylbenzene sulfonate in natural waters*. Appl. Environ. Microbiol. 41, 3, pp 621-627.
- Okpokwasili, G.C. y Olisa, A.O. (1991) *River-water biodegradation of surfactants in liquid detergents and shampoos*. Water Research, 25.11, pp 1425-1429.
- Quiroga, J.M. y Sales, D. (1989) *Ensayos de degradación con cepas puras de microorganismos*. Ingeniería Química. Junio, pp 179-183.
- Quiroga, J.M. y Sales, D. (1991) *Surfactant biodegradation in sea water*. Tenside Surfactants Detergents, 28, 3, pp 200-203.
- Raymond, A. (1996) *The global outlook for surfactant from a U.S. perspective*. 4th World Surfactant Congress. Vol. 1, pp 21-36.
- Romero, L.; Perez, M.; Sales, D. (1997) *Degradation kinetics of distillery wastewaters by immobilized anaerobic mixed cultures*. The 8th International Conference on Anaerobic Digestion (AD-97). IAWQ. Japan, May.
- Schröder, H, Fr. (1993) *Surfactants: non-biodegradable, significant pollutants in sewage treatment plant effluents*. Journal of Chromatography, 647, pp 219-234.
- Sivak, A., Goyer, M. y Perwak, J. (1982) *Environmental and human aspects of commercially important surfactants*. Solution behaviour of surfactants. Ed. Plenum Publishing Corp. Vol 1, pp 161-188.
- Wang, Z. y Fingas, M. (1993) *Rapid separation of non-ionic surfactants of polyethoxylated octylphenol and determination of ethylene oxide oligomer distribution by C1 column reversed-phase liquid chromatography*. Journal of Chromatography, 637, pp 145-156.
- Yoshimura, K. (1986) *Biodegradation and fish toxicity of nonionic surfactants*. Japan Surface Active Agent Association. 63, 12, pp 1590-1596.