

## Desetoxilación completa de nonilfenol polietoxilado acoplada a desnitrificación

Luppi, L. I.<sup>(i)</sup>; Hardmeier, I.<sup>(ii)</sup>; Lozada, M.<sup>(iii)</sup>; Erijman, L.<sup>(iii)</sup>; de Tullio, L.A.<sup>(i)</sup>; Itria, R. F.<sup>(i)</sup>

<sup>(i)</sup>INTI-Ingeniería Ambiental

<sup>(ii)</sup>INTI-Química

<sup>(iii)</sup>Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular (INGEBI-CONICET)

### Introducción

Los nonil fenoles polietoxilados (NPEO's) están entre los tensioactivos más utilizados de nuestro país. Se emplean principalmente en la formulación de detergentes industriales y domésticos (>50 % del mercado local), en agricultura como emulsificantes de herbicidas e insecticidas y en la composición de lubricantes de cintas transportadoras. También constituyen importantes auxiliares en la industria textil.

En las últimas décadas se detectó la acumulación de NPEO's de cadena corta (con 1 a 4 moles de óxido de etileno "EO") y nonil fenol (NP) en los distintos compartimientos ambientales. Estos metabolitos son el resultado de una degradación incompleta del NPEO y resultan más tóxicos que el compuesto parental, bioacumulables, persistentes y con efecto pseudo estrogénico. Como consecuencia de estos efectos nocivos, en los últimos años los países miembros de la Unión Europea han prohibido el uso de este tipo de tensioactivos. Hasta el presente no se conocen los caminos metabólicos de la mineralización total de los NPEO's.

Existen evidencias que muchos compuestos orgánicos que no resultan biodegradables en condiciones aeróbicas o son pobremente biodegradados en condiciones anaeróbicas, pueden ser efectivamente utilizados por organismos desnitrificantes como fuente de carbono <sup>[1]</sup>.

En los últimos años ha crecido el interés por los tratamientos desnitrificantes para efluentes líquidos que contienen compuestos recalcitrantes, no sólo por lo novedoso del potencial metabólico presente en estas condiciones sino también por la posibilidad de combinar la eliminación de materia orgánica refractaria con la remoción de nitrato.

La mayoría de las industrias manufactureras generan efluentes que contienen nitratos: éstos representan un problema de importancia mundial ya que son

causantes de eutroficación en cuerpos de agua y contaminación del agua potable, que puede resultar particularmente nociva en niños y madres en período de lactancia <sup>[2]</sup>.

### Objetivos

Avanzar en el conocimiento de la química del proceso degradativo de los NPEO's, con el monitoreo de la biodegradación mediante análisis químicos convencionales y de alta resolución como resonancia magnética nuclear protónica (RMN <sup>1</sup>H) y cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa (GC-MS).

Investigar cambios en la estructura de la comunidad microbiana a partir de la caracterización de la biomasa mediante técnicas de biología molecular basadas en el marco filogenético dado por el ARN ribosomal 16S mediante la amplificación de una región específica (ADNr 16S) de los genes que codifican para la subunidad ribosomal pequeña 16S por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y resolviendo la mezcla de fragmentos pertenecientes a los diversos filotipos presentes en las muestras con la utilización de electroforesis en geles de gradientes desnaturizantes (DGGE).

### Metodología / Descripción Experimental

Se armaron biorreactores consistentes en frascos de 250 ml, tomando como base un método normalizado <sup>[3]</sup> adaptándolo a las condiciones de ausencia de oxígeno, en los que se colocó biomasa procedente de una planta de tratamiento alimentada con efluente sintético bajo régimen semicontinuo <sup>[4]</sup>, sin adaptación previa al tensioactivo.

Como única fuente de carbono se utilizó NPEO<sub>10</sub> y medio mineral y buffer como se describe en el protocolo de la norma ISO 9888 <sup>[3]</sup>. Para obtener las condiciones desnitrificantes se desalojó el oxígeno con una corriente de nitrógeno y se adicionó NO<sub>3</sub> en una concentración final 20 mM. En paralelo se realizaron

controles fermentativos ( $s/\text{NO}_3$ ), endógenos ( $c/\text{NO}_3$  y sin sustrato) y con aceptores alternativos de electrones ( $\text{CO}_3$  y  $\text{SO}_4$ , ambos a una concentración final 20 mM). Todos los reactores fueron herméticamente sellados con septos de goma.

La biodegradación fue monitoreada mediante la demanda química de oxígeno (DQO) [5], mientras que el análisis de metabolitos se realizó sobre muestras purificadas con columnas de fase reversa C18 mediante RMN  $^1\text{H}$  y CG-MS. La medición de la variación en las concentraciones de  $\text{NO}_3$  se realizó mediante espectrofotometría UV con un método estandarizado [5] y la de  $\text{NO}_2$  con kit AQUAMERCK (Merck, Alemania).

La caracterización de los cambios en la comunidad bacteriana fue hecha colectando muestras de biomasa de los reactores desnitrificantes a distintos tiempos, a las que se les extrajo el ADN total. Los segmentos de ADNr 16S correspondientes a los distintos filotipos bacterianos fueron visualizados en el DGGE como bandas con distintas movilidades electroforéticas.

El ADN de la banda dominante en el día 35 fue purificado, clonado y secuenciado para determinar su ubicación taxonómica mediante la comparación con secuencias de la base de datos GenBank.

## Resultados

El porcentaje de biodegradación resultó ser nulo en los controles fermentativo, sulfidogénico y metanogénico, aún luego de 35 días, sin observarse cambios en el nivel de etoxilación del NPEO<sub>10</sub> como se evidenció en el análisis de RMN  $^1\text{H}$  (ver Fig. 1).

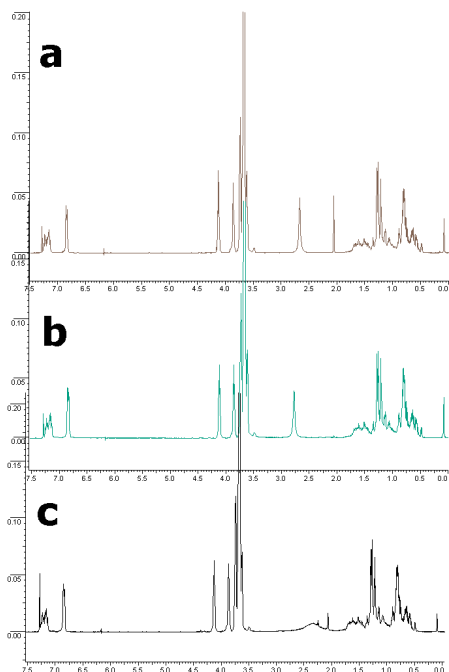


Fig. 1: RMN  $^1\text{H}$  a los 35 días sobre los controles de degradación: [a] fermentativo (NPEO<sub>10</sub> como último aceptor de electrones); [b] sulfidogénico ( $\text{SO}_4$  como último aceptor) y [c] metanogénico ( $\text{CO}_3$  como

último aceptor electrónico). En todos los casos el promedio de EO = 10.

En condiciones desnitrificantes la biodegradación fue del 66 %, detectándose la formación de NP en cantidades mayoritarias (ver Fig. 2).

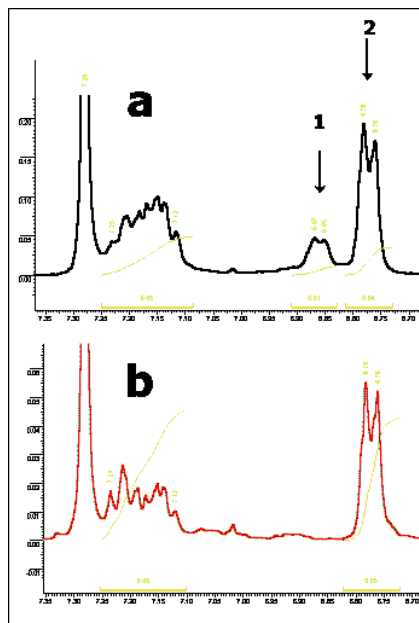


Fig 2: Detalle de la zona aromática del espectro de RMN  $^1\text{H}$  de la degradación en condiciones desnitrificantes a los 35 días (a). La flecha "1" indica los picos correspondientes a los protones del grupo aromático asociado a grupos EO mientras que la flecha "2" señala los picos correspondientes a los protones del NP sin etoxilar, que se encuentra en forma mayoritaria. En (b) puede observarse el detalle de la misma región para una preparación pura de NP.

La aparición de NP fue confirmada mediante GC-MS a los 35 días de iniciado el ensayo (ver Fig. 3).

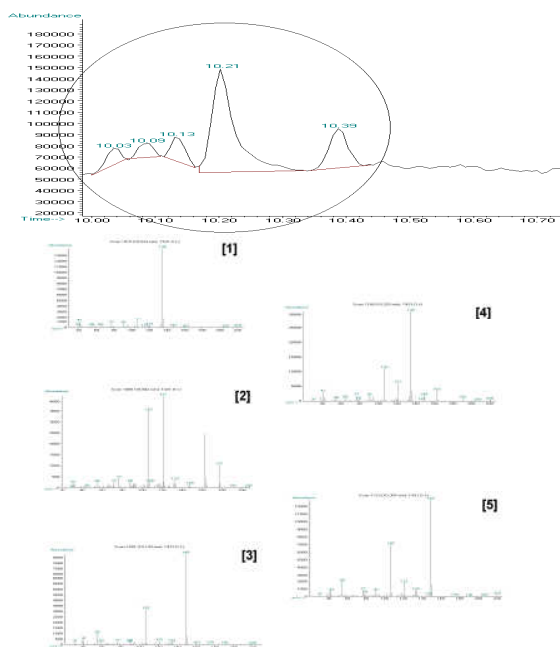


Fig. 3: Cromatograma GC (parte superior) y MS (inferior). Los números 1 al 5 se refieren a los distintos picos en el GC y corresponden a diferentes isómeros de NP. En el transcurso de la biodegradación en presencia de  $\text{NO}_3^-$ , se observó el descenso de la DQO y del número de unidades EO en conjunto con una disminución de la concentración de nitrato y un aumento en la de nitrito (ver Fig. 4).

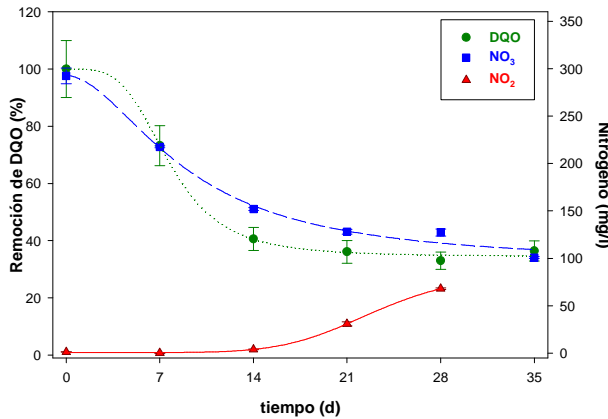


Fig. 4: Degradación anóxica del  $\text{NPEO}_{10}$ , acoplada a la desnitrificación.

Los análisis de DGGE, coincidentemente con la formación de NP y la disminución de la concentración de nitrato, mostraron un enriquecimiento en un filotipo bacteriano (ver Fig. 5) asociado a especies desnitrificantes pertenecientes a la subclase beta de la división Proteobacteria (ver Fig. 6).



Fig. 5: DGGE de reactores desnitrificantes. Los números en la parte superior indican los días de muestreo. Mk indica la

posición de marcadores de ADN. De este gel se extrajo la banda correspondiente al día 35, señalada por la flecha verde superior.

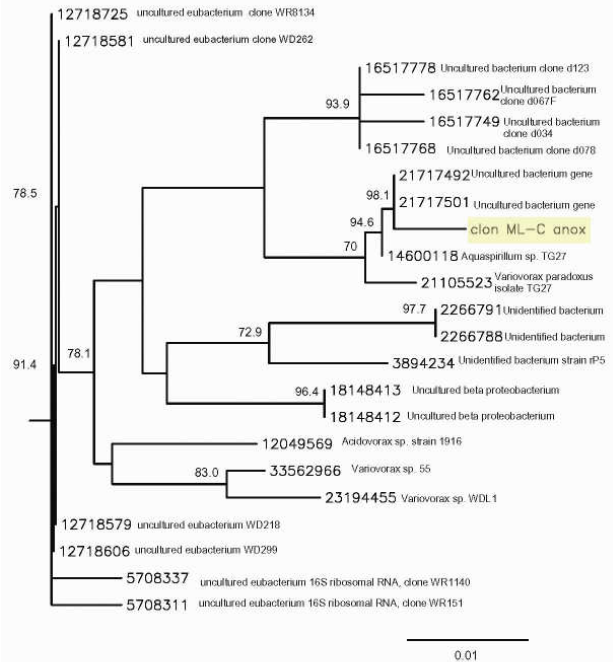


Fig. 6: Árbol filogenético donde se muestra la relación del clon obtenido del DGGE con miembros del phylum beta-Proteobacteria.

### Conclusiones

Condiciones desnitrificantes conducen a la degradación anóxica del  $\text{NPEO}_{10}$ , siendo este el primer reporte de formación de NP a partir de  $\text{NPEO}$ 's de cadena larga.

El proceso de desetoxilación completa estaría acoplado a la utilización de  $\text{NO}_3^-$  como último aceptor de electrones.

EL análisis del perfil de la comunidad bacteriana indica una posible correlación entre la formación de NP y el predominio de un filotipo relacionado con miembros no cultivados de la subclase beta de *Proteobacteria*, algunos de los cuales se encuentran relacionados con procesos de remoción de nitrato [6, 7].

Aunque existe un reporte previo de desetoxilación completa en condiciones anóxicas (en presencia de  $\text{CO}_2$ ) la misma se observó solamente sobre sustratos con bajo número de etoxilación ( $\text{NPEO}_{1-2}$ ) y con inóculos adaptados previamente a  $\text{NPEO}$ 's durante períodos prolongados [8].

Si bien el NP obtenido tiene una toxicidad mayor que el compuesto parental, los resultados presentados en el presente trabajo junto con los numerosos reportes de

---

degradación aeróbica de NP <sup>[9, 10, 11]</sup> abren la posibilidad de diseñar configuraciones de tratamientos biológicos en donde se combine una primera etapa anóxica que permita la transformación del NPEO a NP, para luego continuar con una etapa aeróbica en la que se logre la mineralización completa del NP formado en la primera etapa, por lo que este trabajo resulta una contribución significativa tendiente a lograr la biodegradación total de este tipo de tensioactivos

Se plantea en consecuencia la necesidad de continuar realizando estudios biotecnológicos en esta dirección utilizando plantas piloto de tratamiento de efluentes, con el fin de evaluar la factibilidad de este enfoque novedoso para poder ser trasladado a escalas reales.

### **Agradecimientos**

Los autores desean agradecer especialmente a la Lic. Ana Hernández, de INTI-Química por su valiosa colaboración en la corroboración de datos en las determinaciones de NO<sub>2</sub> y NO<sub>3</sub>.

### **Referencias**

- [1] Y. M. Li, G. W. Gu, et al., "Anoxic degradation of nitrogenous heterocyclic compounds by acclimated activated sludge." *Process Biochemistry* 37(1): 81-86, 2001.
- [2] Canter, L. W., "Nitrates in Groundwater." CRC Lewis Publishers: New York, 1997; pp 15-17.
- [3] ISO, "ISO 9888 - Water quality - Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds in an aqueous medium - Static test (Zahn-Wellens method)." International Organization for Standardization. Switzerland, 1999.
- [4] ISO, "ISO 9887 - Water quality - Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds in an aqueous medium - Semi-continuous activated sludge method (SCAS)." International Organization for Standardization. Switzerland, 1992.
- [5] APHA, AWWA, et al. "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 18th ed." American Public Health Association. Washington DC, 1992.
- [6] C. C. Wang & C. M. Lee. "Denitrification with acrylonitrile as a substrate using pure bacteria cultures isolated from acrylonitrile-butadiene-styrene wastewater." *Environment International* 26(4): 237-241, 2001.
- [7] T. R. Thomsen, J. L. Nielsen, et al. "Micromanipulation and further identification of FISH-labelled microcolonies of a dominant denitrifying bacterium in activated sludge." *Environmental Microbiology* 6(5): 470-479, 2004.
- [8] J. Ejlertsson, M. L. Nilsson, et al., "Anaerobic degradation of nonylphenol mono- and diethoxylates in digester sludge, landfilled municipal solid waste, and landfilled sludge." *Environmental Science & Technology* 33(2): 301-306, 1999.
- [9] F. A. Banat, S. Precht, et al., "Aerobic thermophilic treatment of sewage sludge contaminated with 4-nonylphenol." *Chemosphere* 41(3): 297-302, 2000.
- [10] E. Topp & A. Starratt, "Rapid mineralization of the endocrine-disrupting chemical 4-nonylphenol in soil." *Environmental Toxicology & Chemistry* 19(2): 313-318, 2000.
- [11] B. Gejlsbjerg, C. Klinge, et al, "Mineralization of organic contaminants in sludge-soil mixtures." *Environmental Toxicology & Chemistry* 20(4): 698-705, 2001.

Para mayor información contactarse con:  
Lic. Raúl Fabio Itria – [ritria@inti.gov.ar](mailto:ritria@inti.gov.ar)