

Eficiencia de la Degradación Microbiana de Tensioactivos: Algunos Factores Condicionantes

María S. FORTUNATO, Susana ROSSI, Sonia KOROL y Miguel D'AQUINO*

*Cátedra de Higiene y Sanidad. Facultad de Farmacia y Bioquímica.
Universidad de Buenos Aires. Junín 956, 1113 Buenos Aires, Argentina.*

RESUMEN. El vertido de efluentes líquidos industriales y municipales conteniendo compuestos tensioactivos aniónicos en los cursos de agua genera problemas en la vida acuática. Con el fin de remediar esta situación se estudió la capacidad degradativa de poblaciones microbianas ambientales sobre tales compuestos. Como factores participantes en la biodegradación se analizó tanto la adaptación de los microorganismos al sustrato degradable como el inóculo microbiano y la influencia que podría tener la presencia de algún elemento tóxico común en muchos efluentes, tal como el fenol. Los resultados señalaron: a) que la adaptación en un período no inferior a 20 días es un camino importante a fin de lograr la optimización del proceso (mayor del 90% en 8 días), b) que la biodegradación de detergente, en los tiempos establecidos por las normas vigentes, es independiente de la biomasa presente y c) que la presencia de fenol en concentraciones de hasta 100 mg/l no influye en el proceso.

SUMMARY. "Efficiency of Biodegradation of Surfactants: Conditioning Factors". The discharge of industrial and municipal effluents containing anionic surfactants compounds into water streams causes damages in aquatic life. In order to find a solution to this ecological problem, we attempted to study the degradability behaviour of environmental microbial populations on those compounds. The role of the following factors in the biodegradation process were analyzed: the adaptation of the microorganisms to the degradable substratum, the inoculum, and the influence that a common toxic element present in many effluents (phenol) might have. Results showed that: a) adaptation over a twenty day period (at the minimum) is important to optimize the process (higher than 90% in eight days; b) biodegradation of the surfactant is biomass-independent for the period of time regulated by the ASTM (American Society for Testing and Materials) rules; c) phenol in concentration up to 100 mg/l does not influence the process.

INTRODUCCION

El vertido de efluentes líquidos provenientes de la industria cosmética y de medicamentos a los cursos de agua no escapa hoy en día a la problemática de la contaminación ambiental y a las pautas reglamentarias de las legislaciones vigentes en nuestro país. Dichos efluentes contienen una gran variedad de contaminan-

PALABRAS CLAVE: Adaptación, Agentes tensioactivos, Biodegradación

KEY WORDS: Adaptation, Anionic surfactants, Biodegradation

* Autor a quien dirigir la correspondencia.

tes, entre los que se hallan los tensioactivos, cuya acción se suma a los que provienen de otras fuentes, tales como los efluentes municipales y de otras industrias. Los detergentes afectan los ecosistemas acuáticos debido a que dificultan la oxigenación de los mismos ¹, destruyen las branquias de los peces y, en definitiva, causan la muerte del curso de agua, impidiendo sus mecanismos depurativos.

En el área de Buenos Aires (Argentina), la principal fuente de aprovisionamiento de agua, tanto para la metrópoli como sus alrededores, es el Río de la Plata, que constituye un sistema ecológico vinculado a otros ríos y al mar. Este curso de agua actúa además como receptor de diversos efluentes, sean o no industriales.

Se han propuesto diferentes procedimientos para remediar el problema de la contaminación de cursos de agua por agentes tensioactivos, siendo uno de ellos el que utiliza tratamiento biológico de efluentes antes de su vertido final, metodología que se ha empleado en este trabajo. La capacidad metabólica de diferentes especies microbianas juega un papel muy importante en estos casos ^{2,3}, pero en el presente estudio se utilizaron poblaciones mixtas, en especial aquellas aisladas de ambientes contaminados con esos compuestos ⁴, observándose una mayor eficiencia en el proceso. Este criterio es el adoptado por distintas normas tales como la emanada de la American Society for Testing and Materials (ASTM) ⁵, que regula la biodegradabilidad de los detergentes y especifica en su metodología que los ensayos deben realizarse con poblaciones de microorganismos nativos, sin referirse a otras características.

Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue: 1) establecer la capacidad biodegradativa de poblaciones microbianas provenientes del Río de la Plata y de los lodos activados de la industria de detergentes y 2) analizar los factores participantes en el proceso degradador, tales como: a) la adaptación de los microorganismos, b) la biomasa presente y c) la influencia de compuestos tóxicos tales como el fenol, teniendo en cuenta que la susceptibilidad de un compuesto químico a la biodegradación depende no sólo de su estructura, sino de diferentes factores ambientales ^{6,7}. La incorporación del fenol obedeció a que este elemento puede hallarse frecuentemente en los efluentes líquidos provenientes sobre todo de las industrias químicas, en concentraciones que oscilan entre 50 y 300 mg/l ⁸.

MATERIALES Y MÉTODOS

Comunidades microbianas

Se trabajó con poblaciones microbianas provenientes de agua del Río de la Plata y del lodo activado de la planta de tratamiento de efluentes de la industria de detergentes ubicada en el área de Buenos Aires.

Microorganismos adaptados

El proceso de adaptación se llevó a cabo adicionando 1 ml de agua de Río de la Plata a frascos Erlenmeyer con 100 ml de medio basal descrito en las normas de la ASTM, cuya composición es la siguiente: cloruro de amonio 3,0 g, fosfato monopotásico 1,0 g, sulfato de magnesio heptahidratado 0,25 g, cloruro de potasio 0,25 g, sulfato ferroso heptahidratado 0,002 g, extracto de levadura 0,3 g y agua bidestilada c.s.p. 1000 ml (pH 7,2). El agente tensioactivo utilizado fue adicionado asépticamente a dicho medio de manera de tener una concentración de

30 mg/L. Los frascos Erlenmeyer fueron incubados a 28 °C en baño termostatzado con agitación plano-rotatoria a 200 rpm. Posteriormente se efectuaron siembras sucesivas mediante el procedimiento descrito anteriormente, durante 6 ó 20 días de acuerdo con el tiempo de adaptación.

Microorganismos "no adaptados"

La siembra de 0,2 ml de lodo o de agua de río en superficie de placas de Petri con agar nutritivo sin agregado de tensioactivo e incubadas durante 24 horas a 28 °C dio origen a poblaciones microbianas denominadas: "no adaptadas"

Identificación de microorganismos

Los microorganismos que componen las poblaciones mixtas tanto del río como del lodo se aislaron en placas de Petri con agar nutritivo (Merck) suplementado con detergente (10 mg/l). La identificación de dichos microorganismos se efectuó mediante pruebas tintoriales y bioquímicas de acuerdo al sistema API 20 NE (Bio-Merieux), con reacciones adicionales ⁹.

Características del lodo

Algunas características químicas del lodo usado en este estudio fueron las siguientes: pH 7, sólidos totales 27,0 g/l, demanda química de oxígeno 5100 mg/l. Estas determinaciones se realizaron de acuerdo al Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater ¹⁰.

Ensayos de Biodegradación

Los ensayos de biodegradación se llevaron a cabo en frascos Erlenmeyer conteniendo 100 ml de medio basal, detergente en una concentración de 30 mg/l y un inóculo inicial comprendido entre 1×10^6 y 5×10^6 microorganismos/ml. Dichos frascos fueron incubados a 28 °C en baño termostatzado con agitación (200 rpm). A diferentes intervalos de tiempo se tomaron muestras para determinar la cantidad de detergente remanente.

Con el fin de estudiar la influencia del número inicial de microorganismos en la biodegradación de detergentes se tomaron distintas alícuotas del inóculo adaptado de manera de tener concentraciones finales de 10^2 y 10^4 microorganismos/ml.

Compuestos Químicos

Detergente aniónico patrón: Dodecil Benceno Sulfonato de Sodio 10,09% p/v según normas IRAM (Instituto Argentino de Racionalización de Materiales) 25610.

Fenol (Merck): la solución al 1% p/v fue preparada asépticamente disolviendo la cantidad necesaria en hidróxido de sodio 0,1 N.

Para estudiar la influencia del fenol en la biodegradación del detergente, se adicionaron volúmenes apropiados de la solución de fenol a 100 ml de medio basal, de manera de obtener concentraciones finales de 100, 200 y 300 mg/l. Luego del agregado de esta solución fenólica el pH del medio fue controlado, no evidenciándose variaciones.

Procedimientos analíticos

La determinación del detergente aniónico se realizó según el método del azul

de metileno de acuerdo a lo establecido por Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, cuyo límite de detección es de 10 µg calculado como alquil benceno sulfonato linear.

La determinación de fenol se efectuó en forma cuantitativa basándose en la metodología descrita por Young y Rivera ¹¹ para compuestos fenólicos y adaptada para el mismo. Se realizaron lecturas espectrofotométricas a 287 nm en solución de hidróxido de sodio 0,1 N, comparando con curvas patrones de fenol.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los microorganismos que componen la población mixta del río responsables de la degradación del tensioactivo fueron identificados como *Pseudomonas sp* y *Pseudomonas pútida*, con una probabilidad del 98,4%. Asimismo los microorganismos del lodo fueron caracterizados como *Acinetobacter sp.*, *Pseudomonas sp.* y *Aeromonas sp.*

La importancia de la adaptación en el proceso de biodegradación puede apreciarse en las Figuras 1 y 2. En la Figura 1, se observa que tanto los organismos del río como los del lodo que no fueron sometidos a un proceso de adaptación no produjeron cambios apreciables en la reducción del detergente. En la Figura 2 se muestra la influencia de los diferentes períodos de adaptación de los microorganismos del Río de la Plata sobre la biodegradación del tensioactivo comparativamente con los del lodo adaptados naturalmente, por provenir de industria de detergente. Se comprueba que los microorganismos de río adaptados en diferentes períodos degradan a los detergentes en forma desigual, ya que se requiere un período de adaptación no inferior a 20 días para lograr una reducción mayor del 90% dentro de los 8 días, límite especificado por la norma de referencia (ASTM), mien-

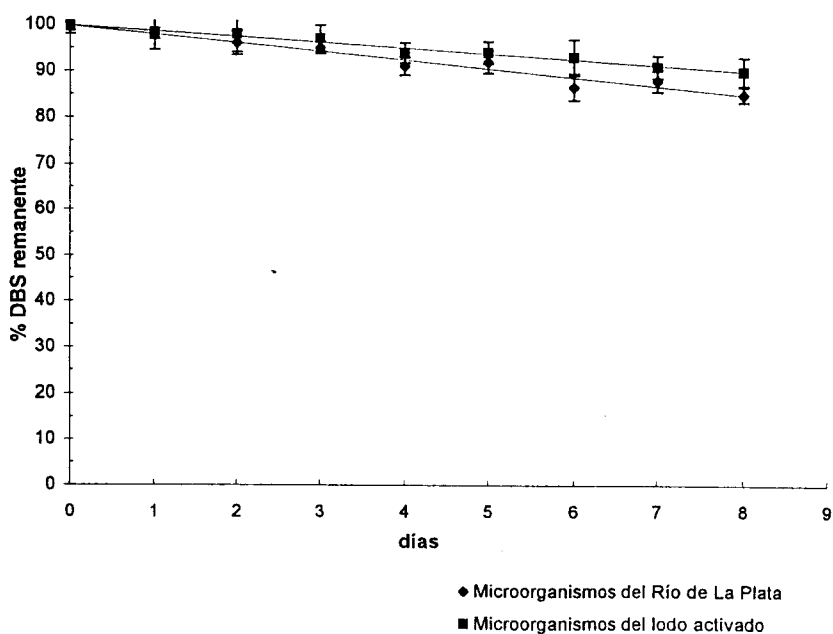


Figura 1. Biodegradación de dodecil benceno sulfonato de sodio por microorganismos “no adaptados” del Río de la Plata y del lodo.

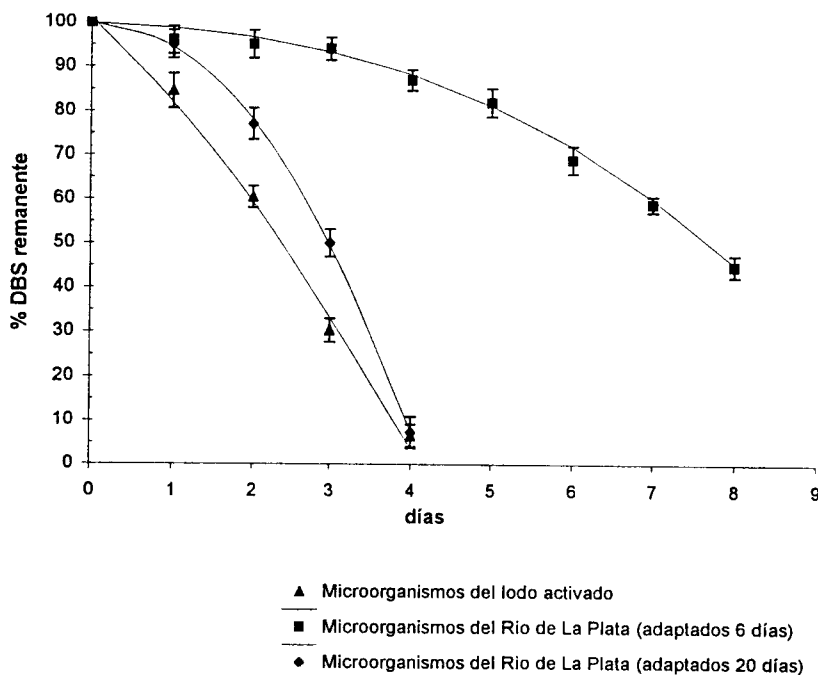


Figura 2. Biodegradación de dodecil benceno sulfonato de sodio por microorganismos adaptados del Río de la Plata y del lodo.

tras que con períodos más cortos de adaptación microbiana (6 días), la degradación alcanza al 50% en ese mismo tiempo. Con los microorganismos del lodo ocurre algo similar pero con mayor intensidad, ya que los mismos se encuentran adaptados naturalmente por provenir de industrias de detergentes.

Las Tablas 1 y 2 demuestran que la biodegradación es independiente de la cantidad de microorganismos presentes. Cualquier inóculo permite alcanzar en 8 días una concentración de biomasa crítica que prácticamente iguala la tasa de reducción del detergente (95%), hecho que ocurre tanto con las poblaciones provenientes del río como de lodos.

Inóculo UFC/ml	% Reducción de Detergente			
	Días de incubación a 28 °C			
	2	4	6	8
10 ²	2,0	38,4	88,0	95,0
10 ⁴	18,3	86,0	90,5	95,2
10 ⁶	23,0	93,7	95,3	95,3

Tabla 1. Influencia del inóculo en la degradación de detergentes con poblaciones adaptadas provenientes del río.

Inóculo UFC/ml	% Reducción de Detergente			
	Días de incubación a 28 °C			
	2	4	6	8
10 ²	5,1	45,4	89,5	95,2
10 ⁴	20,3	88,1	90,0	95,3
10 ⁶	30,6	93,5	95,4	95,6

Tabla 2. Influencia del inóculo en la degradación de detergentes con poblaciones adaptadas provenientes de lodo.

Comparando con las Tablas 1 y 2, en la Tabla 3 puede observarse que las poblaciones microbianas utilizadas en el ensayo de degradación de detergentes no son afectadas por la presencia de fenol hasta una concentración de 100 mg/l, lo que permite inferir que, en esa concentración, este compuesto no interferirá con los tratamientos biológicos de efluentes que contengan dichos contaminantes; por el contrario ambas poblaciones consumieron simultáneamente el fenol (datos no mostrados). Con concentraciones de 200 y 300 mg/l se observa una disminución en el porcentaje de degradación del detergente durante los primeros días con ambas poblaciones. No obstante, en 8 días el proceso es independiente de dichas concentraciones de fenol.

De lo expuesto en este trabajo, puede concluirse que: a) la adaptación de una población microbiana al sustrato tensioactivo que se debe degradar, durante un período no inferior a 20 días, es un camino necesario con el fin de lograr la optimización del proceso (mayor del 90% en 8 días), b) la biodegradación de detergente, en los tiempos establecidos por las normas vigentes, es independiente de la biomasa presente, c) el fenol en concentraciones de hasta 100 mg/l no influye

Días de degradación	% de Reducción de Detergente					
	Microorganismos de Río Fenol mg/l			Microorganismos de Lodo Fenol mg/l		
	100	200	300	100	200	300
2	21,2	18,4	13,2	28,0	22,5	11,3
4	90,2	79,2	79,6	90,1	44,8	25,7
6	93,3	95,3	94,6	93,2	78,3	66,3
8	95,1	95,3	95,2	95,0	93,2	95,0

Tabla 3. Influencia del fenol en la biodegradación de detergentes con inóculo de 10⁶ UFC/ml.

en el proceso y d) concentraciones mayores de fenol (200 y 300 mg/l) influyen negativamente sólo en los primeros días de tratamiento, hasta que las poblaciones microbianas se adaptan a dichas concentraciones. Estos resultados coinciden con lo informado en trabajos anteriores ¹² y con los obtenidos por otros autores ^{13,14}, quienes demostraron que largos períodos de latencia indican que el fenol es tóxico a una concentración dada.

Agradecimientos. A la Universidad de Buenos Aires, por el subsidio otorgado para la realización de este trabajo, a través de la programación UBACYT (1995-1997). A la Bioquímica Sandra Bevilacqua, por la asistencia técnica.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Sigoillot, J.C. & M.H. Nguyen (1992) *Can. J. Microbiol.* **33**: 929-32
2. Horvath, R.S. & B.W. Kofit (1972) *Appl. Microbiol.* **23**: 407-14
3. Hrsak, D. & D. Grbic-Galic (1995) *J. Appl. Bacteriol.* **78**: 487-94
4. Sigoillot, J.C. & M.H. Nguyen (1992) *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 1308-12
5. *Standard Test Method for Biodegradability of Alkylbenzene Sulfonates* (1989) American Society for Testing and Materials D 2667
6. Boethling R. & M. Alexander (1979) *Appl. Environ. Microbiol.* **37**: 1211-6
7. Arvin E., B.K Jensen, & A. T. Gundersen (1989) *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 3221-5
8. Babich, H. & D.L. Davis (1981) *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **1**: 90-109
9. "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" (1984) Williams & Wilkins, Baltimore, USA, Vol I, págs.141-219, 303-7, 545-8
10. "Standard Methods for Examination of Water and Wastewater" (1992) American Public Health Association, Washington D.C., págs. 5.36-5.38
11. Young, L.Y. & M.D. Rivera (1985) *Water Res.* **19**: 1325-32
12. Korol, S., M. Orsingher, P. Santini, J. Moreton & M. D'Aquino (1989) *Rev. Latinoamer. Microbiol.* **31**: 117-20
13. Hill, G.A. & Robinson, C.W. (1975) *Biotechnol. Bioeng.* **17**: 1599-615
14. Rozich, A.F. & Colvin, R.J. (1986) *Biotechnol. Bioeng.* **28**: 965-71