

EVALUACION CUALITATIVA DE INTERMEDIARIOS DURANTE LA DEGRADACION DE NONILFENOLES CON BACTERIAS NITRIFICANTES EN UN REACTOR MSBR

Molina Jiménez, E.A.D.; Torres-Bojorges, A. X. y Buitrón, G.

**Laboratorio de Investigación en Procesos Avanzados de Tratamiento de Aguas/
Unidad Académica Juriquilla - Instituto de Ingeniería UNAM**

RESUMEN

Se evaluó la biotransformación del nonilfenol (NP) por un consorcio nitrificante a través de sucesivas pruebas en lote en un reactor discontinuo con membranas sumergidas (MSBR, por sus siglas en inglés). La evaluación de intermediarios se determinó cualitativamente empleando la extracción en fase sólida y la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. La viabilidad del consorcio nitrificante se determinó con la medición de las concentraciones de amonio y nitrito presentes durante la cinética. Los resultados obtenidos muestran que los isómeros de NP (tNP) se biotransformaron a 4 intermediarios principales por la acción biológica del consorcio presente en el reactor. Se detectó producción de nitrito asociada al consumo de amonio.

INTRODUCCION

El nonilfenol es un compuesto disruptor endocrino (CDE) empleado para la manufactura de diversos antioxidantes, aditivos de aceite, emulsificantes, plásticos, entre otros (Soares et al., 2008). Está formado por un anillo de fenol y una cadena de nueve carbonos en la posición *para*, lo que lo hace un compuesto hidrofóbico con una alta tendencia a adsorberse en diferentes materiales (Ahel et al., 1993).

Diversas investigaciones han corroborado que la presencia de nonilfenol se debe a actividades antropogénicas, siendo la descarga de los efluentes de las plantas de tratamiento cercanas a las zonas urbanas e industriales, las principales causantes de la contaminación por nonilfenol en ríos, estuarios, océanos y sedimentos. (Soares et al., 2008). Estudios con bacterias nitrificantes han mostrado que éstas son capaces de biotransformar diversos disruptores endocrinos, entre ellos el nonilfenol (Kim, et al., 2007; Yi y Harper, 2007). Sin embargo, las bacterias nitrificantes son microorganismos de lento crecimiento, por lo que es necesario contar con altos tiempos de retención de sólidos (TRS) para obtener un inóculo diverso capaz de biodegradar un gran número de compuestos. De tal manera que las plantas de tratamiento convencionales no son eficientes para la completa degradación de CDE's como el NP ya que el TRS del sistema no es adecuado para tener la biodiversidad microbiana requerida (Jacobsen et al., 1993). Una de las ventajas de los reactores MSBR es que nos permiten el desarrollo de microorganismos de crecimiento lento como las bacterias nitrificantes (Aguado. 2007). El objetivo de este trabajo fue determinar cualitativamente los intermediarios producidos durante la biotransformación, por bacterias nitrificantes, de los isómeros de nonilfenol en un MSBR.

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Se evaluaron los intermediarios durante la biotransformación de tNP, así como la actividad nitrificante del consorcio del reactor MSBR. Para ello, se realizó una prueba en lote en un MSBR con duración de 24 h. El reactor está construido en acero inoxidable con recubrimiento de teflón, con un volumen operacional de 7.2 L y volumen de intercambio de

25%. La membrana sumergida está construida de fluoruro de polivinilideno (PVDF) con peso molecular de corte de 250 kDa y área superficial de 0.04 m². El ciclo de operación del reactor fue de 4 fases: llenado (4 min), reacción (1318 min), filtración (108 min) y reposo (10 min). La concentración inicial de isómeros de nonilfenol (tNP) fue de 500 µg/L. El muestreo se realizó cada 4 h. La muestra se centrifugó para separar la fase sólida (lodo) de la fase líquida.

La fase líquida se filtró a través de filtros de fibra de vidrio (GF/A, Whatman) y antes de ajustar el pH a 2 con ácido sulfúrico se tomó un volumen de muestra para determinar compuestos nitrogenados por cromatografía de iones (Dionex IC1500) y por kit AmVer (HACH). Una vez ajustado el pH, se tomó un volumen de 100 mL y se realizó una extracción en fase sólida para la separación y posterior identificación de intermediarios, empleando cartuchos OASIS HLB (WATERS) acondicionados previamente con acetona, a un flujo de 2 mL/min. Los cartuchos se secaron y para obtener los compuestos de interés, éstos se eluyeron con 6 mL de acetona. Posteriormente, se colocaron bajo corriente de nitrógeno (2 mL/min) hasta que la acetona se evaporó completamente. El residuo obtenido se sometió a un proceso de derivatización con piridina y Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida+1% trimetilclorosilano (BSTFA+TMCS 1%). El producto de la derivatización se inyectó en un cromatógrafo de gases (Agilent Technologies 6890N) acoplado a un detector de espectrometría de masas (Agilent Technologies 5975). La prueba en lote se realizó por triplicado. Los intermediarios se identificaron analizando el cromatograma obtenido en modo SCAN y utilizando la biblioteca del equipo para su identificación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se determinó la actividad nitrificante del consorcio presente en el MSBR a través del seguimiento de las concentraciones de amonio y nitrito en el tiempo de ciclo (figura 1). La producción promedio de nitrito fue de 282.42±104 mg N/L y el consumo promedio de amonio fue de 272.5±38 mg N/L. La tasa de consumo de amonio fue de .018 h⁻¹ y la tasa de producción de nitrito fue de 0.066 h⁻¹.

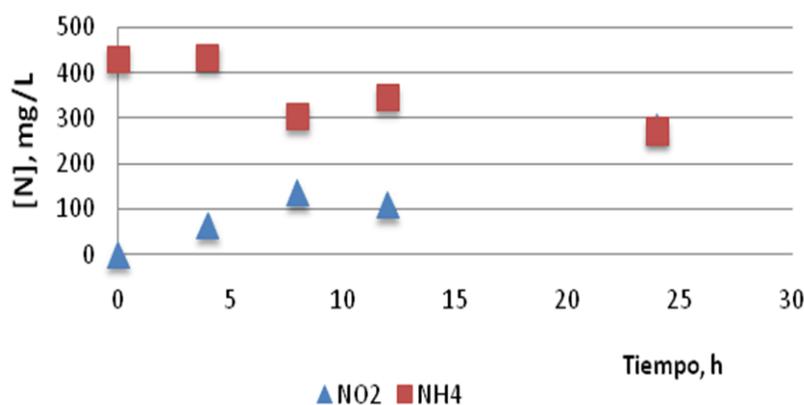


Figura 1. Perfil de consumo y producción de especies nitrogenadas durante la biotransformación de los isómeros de nonilfenol

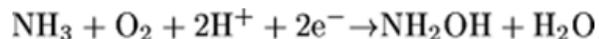
La biotransformación del NP se debe a la acción cometabólica de las bacterias nitrificantes, donde la enzima amonio monooxigenasa (AMO, por sus siglas en inglés) convierte el NH₃ a

NH₂OH en presencia de O₂. Esta reacción produce 4 electrones que son transferidos a la hidroxilamina reductasa, la cual es responsable de la oxidación de hidroxilamina a nitrito.



Ecuación 1

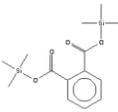
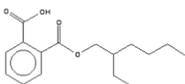
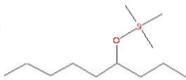
En cada ciclo de la oxidación del amonio, 2 electrones de la hidroxilamina regresan a la membrana de la AMO por medio de canales desconocidos para regenerar la hidroxilamina (Hooper et al., 1997).



Ecuación 2

La AMO contiene un sitio activo de Cu que reacciona con el O₂ para convertir el Cu(I) a Cu(II), este se queda enlazado como un radical electrofílico. Es así como la forma oxigenada de la enzima reacciona con sustratos orgánicos como el nonilfenol (Yi y Harper, 2007). En la tabla 1, se presentan los intermediarios identificados durante el ciclo de operación del MSBR.

Tabla 1. Estructura molecular de los intermediarios obtenidos durante la biotransformación de los isómeros de nonilfenol

Estructura Molecular de Intermediarios	Nombre
	1,2-Acido Benzendicarboxílico, bis(trimetilsilil) ester
	1,2-Acido Benzendicarboxílico, mono(2-ethilhexil) ester
	3,10-Dioxa-2,11,disiladodeca-5,7-diene,2,2,11,11-tetrametil
	Nonanol, 4-0-trimetilsilil

Diversos autores han estudiado la biodegradación del nonilfenol con cepas de *Sphingomonas*, reportando la producción de intermediarios por medio de reacciones de *ipso*-hidroxilación (Frederic et al., 2004). De acuerdo a los resultados obtenidos podemos observar que el intermediario Nonanol, 4-0-trimetilsilil se produjo por medio del reemplazo del grupo hidroxilo al anillo aromático donde el carbono α -cuaternario de la estructura del NP lleva a cabo la formación de un nonanol (Corvini et al., 2004). La figura 2 presenta la posible vía metabólica obtenida.

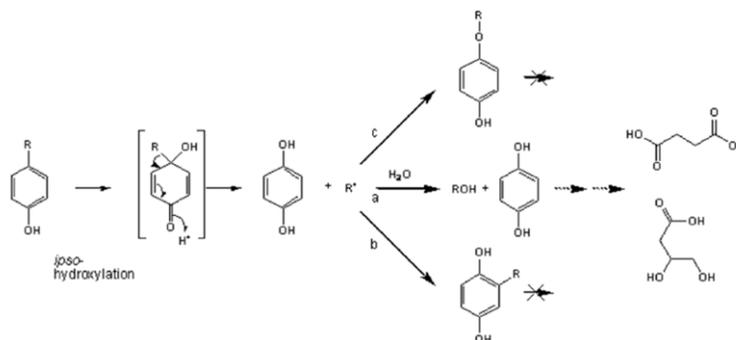


Figura 2. Representación esquemática de rutas propuestas para la formación de nonanol (Gabriel et al., 2008)

CONCLUSIONES

Se identificaron los siguientes subproductos durante la biodegradación de nonilfenol en un reactor MSBR con bacterias nitrificantes: 1,2-Acido Benzendicarboxílico, bis(trimetilsilil) ester, 1,2-Acido Benzendicarboxílico, mono(2-ethilexil) ester; 3,10-Dioxa-2,11,disiladodeca-5,7-diene,2,2,11,11-tetrametil; Nonanol, 4-0-trimetilsilil.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Aguado.J. “Reactores Biológicos de Membrana (MBR): Una alternativa de tratamiento para la reutilización del agua.” Grupo de Ingeniería Química. Universidad de Alcalá.2007.
- Ahel, M. y Giger, W. “Partitioning of alkylphenols and alkylphenol polyethoxylates between water and organic-solvents.” *Chemosphere.* (1993) **26**:1471–1478.
- Corvini.P. F. X., Meesters R. J. W., Schaffer.A., , Schro H. F., Vinken.R. y Hollender.J.” Degradation of a Nonylphenol Single Isomer by *Sphingomonas* sp.Strain TTNP3 Leads to a Hydroxylation-Induced Migration Product” *Applied and Environmental Microbiology.*2004. p. 6897–6900
- Frederic.L.P., Gabriel, Giger.W., Guenther.K., y Kohler.H.P.E.” Differential Degradation of Nonylphenol Isomers by *Sphingomonas xenophaga* Bayram” *Applied Environmental Microbiology.*2004. p. 1123–1129
- Gabriel, F.L.P., Routledge, E.J., Heidlberger, A., Rentsch, D., Guenther, K., Giger, W., Sumpter,J.P. y Kohler, H.-P.E. “Isomer-specific degradation and endocrine disrupting activity of nonylphenols.” *Environ. Sci. Technol.* 2008. **42**: 6399 – 6408.
- Hooper.A.B., Vannelli.T., Bergmann.D.J., y Arciero.D.M.” Enzymology of the oxidation of ammonia to nitrite by bacteria” *Antonie van Leeuwenhoek* 71: 59–67, 1997
- Jacobsen BN, Nyholm N, Pedersen BM, Poulsen O, Ostfeldt P “Removal of organic micropollutants in laboratory activated sludge reactors under various operating conditions: sorption.” *Water Res.*1993, 27(10): 1505–1510
- Kim, J.Y., Ryu, K., Kim, E.J., Choe, W.S., Cha, G.C. & Yoo, I.-K.”Degradation of bisphenol A and nonylphenol by nitrifying activated sludge.” *Process Biochemistry.* 2007. 42, pp. 1470-1474.
- Soares.A., Guieysse.B, Jefferson.B Cartmell.E, Lester.J.N., “Nonylphenol in the environment: A critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters” *Science Direct.*2008
- Yi.T. y Harper.W.F.”The Link between Nitrification and Biotransformation of 17 alpha-Ethinylestradiol” *Environ. Sci. Technol.* 2007, 41, 4311-4316