

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Departamento de Ingeniería Química



Tesis Doctoral:

**BIODEGRADACIÓN Y TOXICIDAD DE TENSIOACTIVOS
COMERCIALES**

Realizada por

Manuela María Lechuga Villena

Dirigida por

D^a Encarnación Jurado Alameda,

D^a. Mercedes Fernández Serrano

y D^a. Josefa Núñez Olea

del Departamento de Ingeniería Química

Granada, Octubre 2005.

BIODEGRADACIÓN Y TOXICIDAD DE TENSIOACTIVOS COMERCIALES

Memoria que presenta la Ingeniera Química Manuela María Lechuga Villena para aspirar el Grado de Doctor en Ingeniería Química.

Granada, Octubre 2005.

Fdo. Manuela María Lechuga Villena

Dña ENCARNACIÓN JURADO ALAMEDA, Catedrática de Ingeniería Química y Directora del Departamento del mismo nombre:

CERTIFICA: Que el presente trabajo sobre “Biodegradación y Toxicidad de Tensioactivos Comerciales” ha sido realizado en este Departamento bajo la dirección de la Dra. Encarnación Jurado Alameda, la Dra. Mercedes Fernández Serrano y la Dra. Josefa Núñez Olea, por la Ingeniera Química Manuela Lechuga Villena para aspirar el grado de Doctor en Ingeniería Química.

Fdo. Encarnación Jurado Alameda

LOS DIRECTORES DE LA TESIS

Fdo. Encarnación Jurado Alameda
Catedrática de Ingeniería Química

Fdo. Mercedes Fernández Serrano
Profesora Titular de Ingeniería Química

Fdo. Josefa Núñez Olea
Profesora Asociada de Ingeniería Química

Agradecimientos

Mi más sincero agradecimiento:

A la Dra. Encarnación Jurado Alameda, a la Dra. Mercedes Fernández Serrano y a la Dra. Josefa Núñez Olea, por su enorme interés y dedicación que han sido imprescindibles para la realización de este trabajo.

A mis compañeros Deisi, Miguel, Nadia, Alejandro y Juanfra, por ayudarme tanto y animarme siempre, sin ellos el camino no hubiera sido tan fácil.

Al resto de miembros del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Granada, por su disponibilidad y amabilidad en todo momento, en especial al Dr. Rafael Bailón Moreno por su enorme entusiasmo y por hacerme ver la ciencia y el mundo de los detergentes como algo apasionante, al Dr. Fernando Camacho Rubio por su gran aportación en la discusión de resultados, y a Rosa Fuentes y Antonio Carmona por resolverme tantos problemas.

A todos los miembros del Departamento de Ingeniería Química, Tecnología de los Alimentos y Tecnologías del Medio Ambiente de la Universidad de Cádiz, por animarme a escribir las primeras palabras de esta tesis y por prestarme tan buenas ideas, en especial a Migue por ayudarme tanto, y a Moha, Marta, Álvaro, Carlos, María, Jose...por su enorme acogida.

A mi familia, por su cariño y apoyo en todos los momentos, en especial a mis padres a quienes debo este trabajo y a mi hermana Magda, referencia y apoyo siempre en la distancia. A mis amigos, por estar siempre a mi lado y por comprenderme siempre, y a Manuel por su enorme paciencia, por su inmensa ilusión en que este trabajo saliese adelante y por confiar tanto en mí.

SUMARIO

RESUMEN	1
1. OBJETIVOS	2
2. INTRODUCCIÓN	19
2.1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS DE LOS DETERGENTES.....	21
2.2. EVOLUCIÓN Y TENDENCIA EN LA UTILIZACIÓN DE TENSIOACTIVOS INDUSTRIALES	24
2.3. AGENTES TENSIOACTIVOS.....	28
2.3.1. PRINCIPALES FAMILIAS DE TENSIOACTIVOS	29
2.3.1.1. Alcoholes grasos etoxilados	30
2.3.1.2. Nonilfenoles polietoxilados.....	32
2.3.1.3. Alquilpoliglucósidos.....	35
2.3.1.4. Lineal alquilbenceno sulfonatos (LAS).....	39
2.3.2. PROPIEDADES Y APLICACIONES DE LOS AGENTES TENSIOACTIVOS	40
2.3.3. IMPLICACIONES AMBIENTALES	47
2.3.4. NIVELES DE TENSIOACTIVOS EN AGUAS SUPERFICIALES.....	50
2.4. BIODEGRADACIÓN. CONCEPTO Y EVALUACIÓN	51
2.4.1. EVALUACIÓN DE LA BIODEGRADABILIDAD	55
2.4.1.1. Ensayos de biodegradación	55
2.4.1.2. Técnicas analíticas para el seguimiento de la biodegradación	63
2.4.2. VARIABLES QUE INFLUYEN EN LA BIODEGRADACIÓN.....	66
2.4.3. MODELOS CINÉTICOS DE BIODEGRADACIÓN	70
2.4.3.1. Introducción.....	70
2.4.3.2. Modelo cinético de primer orden.....	72
2.4.3.3. Cinéticas de Monod, co-metabolismo y segundo orden.....	74
2.4.3.4. Elección del modelo cinético mas adecuado para un conjunto de datos de biodegradación	78
2.4.3.5. Modelo cinético de Quiroga-Sales	83
2.4.3.6. Modelo cinético de Romero	86
2.4.4. RUTAS DE BIODEGRADACIÓN	90
2.4.4.1. Alcoholes grasos etoxilados	91
2.4.4.2. Nonilfenoles polietoxilados.....	93
2.4.4.3. Alquilpoliglucósidos.....	95
2.4.4.4. Lineal alquilbenceno sulfonatos	96
2.4.5. RELACIÓN ENTRE ESTRUCTURA Y BIODEGRADABILIDAD	98
2.4.5.1. Alcoholes grasos etoxilados	98
2.4.5.2. Nonilfenoles Polietoxilados.....	100
2.4.5.3. Alquilpoliglucósidos.....	101
2.4.5.4. Lineal alquilbenceno sulfonatos	101
2.5. TOXICIDAD.....	103
2.5.1. INTRODUCCIÓN.....	103

2.5.2. RELACIÓN ENTRE ESTRUCTURA Y TOXICIDAD	104
2.6. LEGISLACIÓN SOBRE TENSIOACTIVOS.....	107
2.6.1. LEGISLACIÓN EN EL ÁMBITO EUROPEO	108
2.6.2. LEGISLACIÓN EN EL ÁMBITO ESTATAL.....	112
2.6.3. LEGISLACIÓN EN EL ÁMBITO DE LA COMUNIDAD AUTÓNOMA ANDALUZA.....	114
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	115
3.1. TENSIOACTIVOS UTILIZADOS	117
3.2. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	119
3.2.1. ENSAYOS DE BIODEGRADACIÓN	119
3.2.2. TOXICIDAD DE TENSIOACTIVOS.....	122
3.2.3. TOXICIDAD DURANTE EL PROCESO DE BIODEGRADACIÓN	122
3.3. MÉTODOS DE ENSAYO DE LA BIODEGRADABILIDAD	123
3.3.1. ENSAYO ESTÁTICO (ENSAYO DE SELECCIÓN)	123
3.3.1.1. Fundamento del método	124
3.3.1.2. Reactivos y disoluciones	125
3.3.1.3. Equipos.....	127
3.3.1.4. Preparación de las muestras	128
3.3.1.5. Procedimiento y condiciones de operación.....	129
3.3.1.6. Seguimiento de la biodegradación	131
3.3.2. ENSAYO DINÁMICO (ENSAYO DE COMPROBACIÓN).....	132
3.3.2.1. Fundamento del método	132
3.3.2.2. Reactivos y disoluciones	133
3.3.2.3. Equipos.....	134
3.3.2.4. Puesta en marcha de la instalación.....	137
3.3.2.5. Procedimiento y condiciones de operación.....	138
3.3.2.6. Seguimiento de la biodegradación	139
3.3.3. ENSAYO POR EL MÉTODO RESPIROMÉTRICO	141
3.3.3.1. Fundamento del método	142
3.3.3.2. Reactivos y disoluciones	142
3.3.3.3. Equipos.....	142
3.3.3.4. Procedimiento.....	143
3.3.3.5. Toma de datos y expresión de los resultados	144
3.3.4. ENSAYO POR EL MÉTODO DE LA BOTELLA CERRADA.....	145
3.3.4.1. Fundamento del método	145
3.3.4.2. Reactivos y disoluciones	146
3.3.4.3. Equipos.....	146
3.3.4.4. Procedimiento.....	146
3.3.4.5. Toma de datos y expresión de los resultados	146
3.4. MÉTODOS DE ANÁLISIS.....	147
3.4.1. ANÁLISIS DE TENSIOACTIVOS.....	147
3.4.1.1. Método de análisis simplificado para determinación de sustancias activas al azul de metileno (MBAS)	147
3.4.1.2. Método de Wickbold con el Reactivo de Dragendorff	148
3.4.1.3. Método colorimétrico del yodo-yoduro	155

3.4.1.4. Método del carbono orgánico total (TOC)	157
3.4.1.5. Demanda biológica de oxígeno (DBO)	162
3.4.1.6. Oxígeno disuelto.....	164
3.4.2. RECUENTO DE LA BIOMASA.....	164
Fundamento	164
Reactivos y disoluciones	165
Equipos	165
Procedimiento.....	165
3.4.3. PARÁMETROS DE CONTROL	166
3.4.3.1. Determinación de sólidos en suspensión.....	166
3.4.3.2. Demanda Química de Oxígeno (DQO)	167
Agua destilada, ml	168
3.4.4. DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE CALIDAD DE UN MÉTODO ANALÍTICO	169
3.5. DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD	171
3.5.1. FUNDAMENTO	171
3.5.2. REACTIVOS Y DISOLUCIONES.....	172
3.5.3. EQUIPOS	172
3.5.3.1. LUMIStox.....	172
3.5.3.2. Unidad de incubación	172
3.5.4. PROCEDIMIENTO.....	172
3.5.5. EVALUACIÓN	174
3.5.5.2. Determinación de los valores de EC	176
3.5.5.3. Determinación de la toxicidad durante el proceso de biodegradación	176
3.6. PROTOCOLO DE LIMPIEZA	177
4. RESULTADOS.....	179
4.1. BIODEGRADABILIDAD DE TENSIOACTIVOS.....	181
4.1.1. BIODEGRADABILIDAD DE ALCOHOLES GRASOS ETOXILADOS (AGE)	181
4.1.2. BIODEGRADABILIDAD DEL NONILFENOL POLIETOXILADO (NPEO)	192
4.1.3. BIODEGRADABILIDAD DE ALQUILPOLIGLUCÓSIDOS (APG)	194
4.1.4. BIODEGRADABILIDAD DEL LAS	201
4.1.5. BIODEGRADABILIDAD DE MEZCLAS DE ALCOHOLES GRASOS ETOXILADOS Y ALQUILPOLIGLUCÓSIDOS.....	202
4.2. TOXICIDAD DE TENSIOACTIVOS.....	203
4.3. TOXICIDAD DE TENSIOACTIVOS DURANTE EL PROCESO DE BIODEGRADACIÓN	217
5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	233
5.1. DESARROLLO DE MÉTODOS DE ANÁLISIS PARA EL ESTUDIO DE LA BIODEGRADACIÓN PRIMARIA	235
5.1.1. MÉTODO SIMPLIFICADO DE ANÁLISIS PARA LA DETERMINACIÓN DE TENSIOACTIVOS ANIÓNICOS (MBAS).....	235

5.1.1.1. Parámetros de calidad del método analítico	240
5.1.2. MÉTODOS DE ANÁLISIS PARA DETERMINACIÓN DE ALCOHOLES GRASOS ETOXILADOS	246
5.1.2.1. Método colorimétrico del yodo-yoduro	246
5.1.2.2. Método de Wickbold con el Reactivo de Dragendorff	251
5.1.2.3. Comparación de métodos de análisis para alcoholes grasos etoxilados.....	257
5.1.2.4. Aplicación de los métodos de análisis para mezclas tensioactivas de AGE y APG.....	259
5.2. BIODEGRADACIÓN DE ALCOHOLES GRASOS ETOXILADOS.....	264
5.2.1. INFLUENCIA DEL GRADO DE ETOXILACIÓN Y LA LONGITUD DE LA CADENA CARBONADA SOBRE LA BIODEGRADACIÓN PRIMARIA.....	265
5.2.2. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE TENSIOACTIVO EN EL PROCESO DE BIODEGRADACIÓN	270
5.2.3. PARÁMETROS CARACTERÍSTICOS DEL PROCESO DE BIODEGRADACIÓN.....	272
5.2.4. CRECIMIENTO DE LA BIOMASA DURANTE EL PROCESO DE BIODEGRADACIÓN.....	280
5.2.5. PARÁMETROS CARACTERÍSTICOS DE LAS CURVAS DE CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS	286
5.2.6. ESTUDIO CINÉTICO DE LA BIODEGRADACIÓN PRIMARIA DE LOS AGE	289
5.2.6.1. Modelos cinéticos para la biodegradación de un sustrato que no soporta el crecimiento de los microorganismos.....	289
5.2.6.2. Modelos cinéticos para la biodegradación de un sustrato que soporta el crecimiento de los microorganismos.....	301
Aplicación y comprobación del modelo cinético propuesto para la evaluación de los parámetros cinéticos.....	315
5.3. BIODEGRADACIÓN DE NONILFENOL POLIETOXILADO	323
5.3.2. ESTUDIO CINÉTICO DE LA BIODEGRADACIÓN PRIMARIA DEL NPEO	328
5.4. BIODEGRADACIÓN DE TENSIOACTIVOS DURANTE EL ENSAYO DINÁMICO	334
5.4.1. PUESTA EN MARCHA DE LA INSTALACIÓN	334
5.5. BIODEGRADACIÓN DE ALQUILPOLIGLUCÓSIDOS	341
5.5.1. BIODEGRADACIÓN DE APG POR EL MÉTODO DE LA BOTELLA CERRADA.....	343
5.5.2. CRECIMIENTO DE LA BIOMASA DURANTE EL PROCESO DE BIODEGRADACIÓN.....	347
5.5.3. BIODEGRADACIÓN DE APG POR EL MÉTODO MANOMÉTRICO RESPIROMÉTRICO	353
5.6. BIODEGRADACIÓN DEL LAS	364
5.6.1. ESTUDIO CINÉTICO DE LA BIODEGRADACIÓN PRIMARIA DEL LAS	368
5.7. COMPARACIÓN DE LA BIODEGRADABILIDAD Y CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS DE LOS TENSIOACTIVOS ANALIZADOS	380
5.8. BIODEGRADACIÓN DE MEZCLAS DE AGE Y APG	384

5.8.1. CRECIMIENTO DE LA BIOMASA DURANTE EL PROCESO DE BIODEGRADACIÓN CONJUNTA DE AGE Y APG	387
5.8.2. ESTUDIO CINÉTICO DE LA BIODEGRADACIÓN PRIMARIA DE MEZCLAS DE AGE Y APG	391
5.9. TOXICIDAD DE TENSIOACTIVOS.....	394
5.9.1. DETERMINACIÓN DE LOS VALORES DE EC ₂₀ y EC ₅₀	395
5.10. TOXICIDAD DE TENSIOACTIVOS DURANTE EL PROCESO DE BIODEGRADACIÓN	405
6. CONCLUSIONES	413
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	419
LISTA DE TABLAS.....	439
LISTA DE FIGURAS.....	449
NOMENCLATURA	457

RESUMEN

El futuro de la producción y consumo de detergentes durante los próximos años va a estar fuertemente condicionado por factores ecológicos y energéticos fundamentalmente. Al producto tensioactivo se le exigen una serie de condiciones óptimas de comportamiento en cuanto a precio, acción a baja temperatura (ahorro energético), máximo rendimiento para distintas superficies y suciedades, no toxicidad, no irritabilidad, no alteración del medio ambiente, desarrollo de la función en tiempo corto, etc. Todo esto hace que la formulación de detergentes requiera el concurso de una investigación fundamental y aplicada muy intensa.

Dentro del sector de detergentes, existe un subsector no suficientemente conocido que fabrica y vende productos especiales para la aplicación en la industria, colectividades, restauración y hostelería. La formulación de estos productos presenta características específicas, ya que son normalmente utilizados por aplicadores profesionales. Este mercado representa un 10% del conjunto del sector, pero teniendo en cuenta los crecientes requisitos en materia de higiene y la evolución de un turismo de mayor calidad en el caso de restauración y hostelería, existen fundadas esperanzas de crecimiento de este sector, mucho mayor que en el resto de sectores de detergentes y jabones (Maceda, 1995).

Los detergentes industriales son productos altamente contaminantes, debido a su especial composición química, provocando un efecto sobre las aguas residuales bastante intenso si se tiene en cuenta la cantidad vertida y la frecuencia con que se vierten. Esto puede ocasionar problemas de eutrofización y problemas graves para la salud como niveles elevados de cloro, que pueden producir compuestos clorados de naturaleza no bien conocida, algunos posiblemente de carácter tóxico y/ o carcinogénico o los posibles efectos a largo plazo de los detergentes sobre el organismo humano, que aunque no son suficientemente conocidos, se le atribuyen diversas acciones dermatológicas, neurológicas, cardiológicas etc.

En cuanto a la formulación típica de los detergentes líquidos industriales utilizados, podemos decir que combinan la acción química causada por su alta alcalinidad y efecto oxidante con la acción tensioactiva y con la acción mecánica del flujo de líquido. Para ello incorporan los siguientes compuestos (Davidsohn , 1987; Falbe, 1987):

i) *Hidróxido potásico o sódico* en proporción elevada (5-15 %). Su función consiste en saponificar las grasas adheridas para su eliminación y coadyuvar en la acción tensioactiva mediante el jabón formado. Se prefiere usar KOH porque los jabones potásicos son más blandos y se adhieren menos que los sódicos, aunque por razones de coste suele utilizarse extensamente NaOH. Otra de sus funciones es promover la solubilidad por hidrólisis de sustancias insolubles (proteínas, almidones) o coloreadas.

ii) *Tensioactivos de baja espuma* (0-2 %). Suelen ser tensioactivos no iónicos, la mayoría son derivados polietilénicos o polipropilénicos de alquilfenoles, ácidos grasos, alcoholes y amidas (Rossen, 1989; Schick, 1987). No causan una disminución importante de la tensión superficial en la interfase agua/aire por lo que producen poca espuma y no interfieren en la acción mecánica.

iii) *Reforzadores* (0-10%) del grupo de los fosfatos (pirofosfato tetrasódico-TSPP, tripolifosfato sódico-STP, pirofosfato tetrapotásico-TKPP, trimetafosfato sódico o trisódico o tripotásico), que empiezan a ser sustituidos por citrato sódico por su mejor efecto secuestrante y solubilidad. Su función es compleja y variada: se utilizan por su capacidad para controlar la dureza del agua y regular la alcalinidad final del producto por su acción como tampones y su capacidad defloculante.

iv) *Agentes secuestrantes* o quelantes respecto a cationes metálicos, como son ácido nitrilotriacético (NTA) (0-15 %) o EDTA sódico (0-5 %).

v) *Silicato sódico* (0-20 %), de efecto protector (anticorrosivo) de las superficies metálicas y de porcelana por formación de monocapas.

vi) *Fosfonatos* (0-2%) de acción redispersante de la suciedad una vez eliminada.

vii) *Cloro* (hipoclorito sódico o dicloroisocianurato sódico) (0-5 %) de efecto oxidante y blanqueante.

viii) *Polímeros acrílicos* (0-5 %) de acción dispersante.

ix) *Colorantes y agua* (c. s.).

Estos detergentes tienen efectos secundarios nocivos entre los que destacaremos los siguientes (Falbe, 1987; Tadros, 1993):

a) *Efectos medioambientales:*

- Elevada alcalinidad de las aguas residuales (pH superior a 12) causadas por la sosa o potasa.
- Altos niveles de fosforo que causan problemas de eutrofización en las aguas.
- Formación de espumas indeseables (contenidos admisibles < 0.3 mg/L de tensioactivo (Marín, 1995), que se estabilizan con la presencia de sales minerales disueltas, partículas finamente divididas, proteínas etc.
- La presencia de detergentes en las aguas interfiere el poder depurador de las aguas ya que disminuyen la absorción de oxígeno de la atmósfera

b) *Poder corrosivo:*

- El contenido en sosa o potasa también puede causar ataque químico sobre las piezas de las máquinas de lavado y erosionar las superficies a limpiar, creando microespacios libres donde pueden proliferar bacterias u otros microorganismos.

c) *Efectos sobre la salud:*

- Si son sustituidos los fosfatos por otros secuestrantes como el NTA o EDTA no se evita el problema de la eutrofización y existe un problema añadido, los iones pesados como plomo o mercurio son también secuestrados y solubilizados. Estos iones no pueden ser retirados del ciclo del agua precipitándolos junto con los lodos en las plantas de tratamiento. Estos iones entrarían a formar parte del ciclo del agua y al ser ingeridos son tóxicos y al atravesar la barrera placentaria pueden ocasionar problemas mutagénicos.
- Niveles elevados de cloro y de compuestos de adición clorados de naturaleza no bien conocida, algunos posiblemente de carácter tóxico y/ o carcinogénico.
- Problemas de accidentes de carácter grave si son ingeridos de forma involuntaria por la excesiva alcalinidad de estos detergentes.

- Los efectos a largo plazo de los detergentes sobre el organismo humano, no son suficientemente conocidos, pero se le atribuyen diversas acciones dermatológicas, neurológicas, cardiológicas etc. (A. Llopis y col 1987)

Resolver todos estos problemas mediante la formulación de un detergente que sea capaz de trabajar en medios menos agresivos y que consiga una alta eficacia de lavado es actualmente un reto en el campo de las empresas que se dedican a la fabricación y comercialización de este tipo de detergentes, y serían muy bien acogidos tanto por los consumidores como por las empresas que fabrican la maquinaria específica y necesaria en el proceso de lavado.

En la presente tesis doctoral se han analizado y evaluado la biodegradabilidad y toxicidad de diferentes tensioactivos no iónicos comerciales: alcoholes grasos etoxilados (AGE) con diferentes grados de etoxilación, alquilpoliglucósidos (APG) y Nonilfenol polietoxilado (NPEO) además del tensioactivo aniónico lineal alquilbenceno sulfonato (LAS), ampliamente utilizado en formulaciones comerciales, con objeto de comparación. Simultáneamente al proceso de biodegradación se ha analizado el crecimiento de microorganismos, evaluando las unidades formadoras de colonias así como la toxicidad de los productos de degradación generados durante este proceso.

Este análisis permitirá decidir sobre la inclusión de un determinado tensioactivo en una formulación específica atendiendo a criterios medioambientales.

Para el estudio de la biodegradabilidad de tensioactivos no iónicos etoxilados se ha seguido la NORMA UNE 55-844-91, poniendo a punto y aplicando un procedimiento de análisis simplificado, basado en la formación de un complejo coloreado entre el tensioactivo no iónico y el reactivo yodo-yoduro. La bondad del método analítico ha resultado dependiente del número de moles de óxido de etileno del tensioactivo, ya que tanto el límite de detección como la sensibilidad del método disminuyen con el número de moles de óxido de etileno del tensioactivo ensayado. Este método puede ser aplicado para el estudio de la biodegradación de tensioactivos no iónicos cuyo grado de etoxilación sea mayor de cinco en el rango de concentraciones de 0 a 5 mg/L, rango de interés en el estudio de biodegradabilidad en aguas residuales.

Además se ha comprobado que la presencia de tensioactivos alquilpoliglucósidos no interfieren de forma importante en la medida de alcoholes grasos etoxilados por lo que

el método colorimétrico del yodo-yoduro puede utilizarse para el seguimiento de la biodegradabilidad de mezclas de alcoholes grasos etoxilados y alquilpoliglucósidos.

Para la estimación de tensioactivos aniónicos MBAS se propone una simplificación del método normalizado especificado por la norma UNE EN 903. Dicha simplificación implica la extracción del par iónico formado entre el tensioactivo y el azul de metileno en una sola etapa, desplazando el equilibrio de transferencia del par iónico hacia la fase orgánica (cloroformo) y aumentando la relación volumen de fase orgánica /volumen de muestra ensayada en el proceso de extracción. El procedimiento propuesto elimina las etapas de filtración necesarias en el método oficial. Cuando se ha aplicado a la determinación del LAS los resultados óptimos han sido para una relación volumen de fase orgánica/volumen de muestra de 5/4, alcanzándose un límite de detección de 0.22 mg/L y un límite de cuantificación de 0.73 mg/L para este tensioactivo.

Obtenidos los perfiles de biodegradación para los tensioactivos alcoholes grasos etoxilados, nonilfenol polietoxilado y LAS, se han definido parámetros característicos del proceso de biodegradación: tiempo de latencia, biodegradabilidad, tiempo de vida media, velocidad media de biodegradación y concentración residual de tensioactivo. Estos parámetros se modifican con la concentración de tensioactivo ensayada, indicando que a medida que aumenta la concentración de tensioactivo se produce una disminución de la velocidad del proceso de biodegradación, un aumento del tiempo de vida media, una disminución de la biodegradabilidad y un aumento de la concentración residual de tensioactivo.

También se ha cuantificado la velocidad media de biodegradación, V_M . Para AGE resulta aumentar con el número de moles de óxido de etileno del tensioactivo y el peso molecular de éste, siendo este efecto más acusado para concentraciones mayores de 25 mg/L. Este hecho se confirma con los perfiles de crecimiento de microorganismos, donde se observa una mayor concentración de UFC cuando es mayor el número de moles de OE del tensioactivo.

A partir de las curvas de crecimiento de microorganismos, se han definido y evaluado parámetros característicos durante el proceso de biodegradación: la velocidad específica de crecimiento (k), el número máximo de unidades formadoras de colonias (UFC/ml, $_{max}$) y el rendimiento de producción de biomasa por gramo de tensioactivo tratado (Y_{ap}). Estos parámetros han servido para establecer que el modelo cinético que

explica la biodegradación de los tensioactivos ensayados, alcoholes grasos etoxilados, alquilpoliglucósidos, nonilfenol polietoxilado y LAS son aquellos que soportan el crecimiento de microorganismos.

Según estos modelos, la cinética de biodegradación de tensioactivos alcoholes grasos etoxilados, alquilpoliglucósidos, nonilfenol polietoxilado y LAS puede ser explicada suponiendo crecimiento de microorganismos según Monod y un modelo para sustancias que soportan el crecimiento de microorganismos, según la ecuación:

$$x = \frac{\alpha_0 x_m \left(1 - \exp \left(-\frac{\mu_m}{\beta_s} (x_m + \alpha_0) t \right) \right)}{x_m \exp \left(-\frac{\mu_m}{\beta_s} (x_m + \alpha_0) t \right) + \alpha_0}$$

Este modelo puede ser aplicado hasta concentraciones de 25 mg/L para alcoholes grasos etoxilados y nonilfenol polietoxilado, y hasta 50 mg/L para el LAS.

La aplicación del modelo cinético para los tensioactivos que han sido evaluados utilizando el ensayo estático (Screening Test, OECD, 1976) ha permitido determinar los parámetros cinéticos característicos, velocidad específica de crecimiento máxima μ_m y la constante de saturación K_S , parámetros necesarios para el diseño de sistemas de biodegradación para estos productos en estaciones depuradoras y que han permitido la comparación de todos los tensioactivos ensayados.

Los parámetros característicos obtenidos de los modelos han sido los que aparecen en la siguiente tabla:

FINDET 1214N/23		
S₀, mg/L	μ_m, h⁻¹	K_S, mg/L
5	0.027	1.009
15	0.027	1.009
20	0.027	1.009
25	0.016	1.265
FINDET 1618A/18		
S₀, mg/L	μ_m, h⁻¹	K_S, mg/L
5	0.023	0.201
25	0.014	1.877
FINDET 1214N/16		
S₀, mg/L	μ_m, h⁻¹	K_S, mg/L
5	0.030	0.156
25	0.008	2.920
FINDET 1618A/23		
S₀, mg/L	μ_m, h⁻¹	K_S, mg/L
5	0.017	0.257
FINDET 10/18		
S₀, mg/L	μ_m, h⁻¹	K_S, mg/L
5	0.010	0.415
FINDET 10/15		
S₀, mg/L	μ_m, h⁻¹	K_S, mg/L
5	0.018	0.275
NPEO		
S₀, mg/L	μ_m, h⁻¹	K_S, mg/L
5	0.1346	1.780
25	0.0127	1.780
LAS		
S₀, mg/L	μ_m, h⁻¹	K_S, mg/L
5	0.054	4.171
25	0.054	4.171
50	0.054	4.171

Este modelo no es aplicable para concentraciones de tensioactivo elevadas (50 mg/L para los AGE y NPEO). A estas concentraciones se produce una inhibición de los microorganismos, siendo necesario evaluar una constante de inhibición, K_i, que ha resultado ser mayor para los tensioactivos de mayor peso molecular y mayor etoxilación. Su cálculo se ha realizado aplicando el modelo de Andrews:

$$\frac{\beta_s}{x_m + \alpha_0} \ln \left(\frac{x_m (\alpha_0 + x)}{\alpha_0 (x_m - x)} \right) + (1 + \beta_i (x_m + \alpha_0)) \ln \left(\frac{\alpha_0 + x}{\alpha_0} \right) - \beta_i x = \mu_m t$$

Las constantes de inhibición encontradas han sido:

FINDET 1214N/23	
S₀, mg/L	K_i, mg/L
50	1515.15
FINDET 1618A/18	
S₀, mg/L	K_i, mg/L
50	2500
FINDET 1214N/16	
S₀, mg/L	K_i, mg/L
50	71.32
NPEO	
S₀, mg/L	K_i, mg/L
50	125

La biodegradación de los tensioactivos alquilpoliglucósidos ha sido realizada aplicando los métodos de la botella cerrada (301 D OEDC, 1993b) y el método respirométrico (301 F OEDC, 1993b) evaluando la DBO. El estudio de los perfiles de biodegradación ha permitido la evaluación de la biodegradabilidad de estos tensioactivos determinando la velocidad específica de crecimiento μ , la constante de mineralización K_{min} y la constante de saturación K_S para estos tensioactivos. La comparación de la biodegradación de los tensioactivos alquilpoliglucósidos y el alcohol graso etoxilado Findet 1618A/18 ha determinado que el porcentaje de mineralización alcanzado y la velocidad específica de crecimiento de microorganismos μ sigue la secuencia GCP215 > Findet 1618A/18 > GCP 600 > GCP 650.

La determinación de la velocidad específica de crecimiento máxima obtenida μ_m para los tensioactivos AGE, NPEO y LAS aplicando el modelo cinético de Monod, y admitiendo la clasificación de biodegradabilidad según Blok (Blok, 1996), evaluada por el método respirométrico y tomando como referencia el tensioactivo Findet 1618 A/18 que se ha analizado mediante los dos procedimientos, ensayo estático y método respirométrico, ha determinado que los tensioactivos alcoholes grasos etoxilados Findet 1214N/23, Findet 1214N/16 con mayor grado de etoxilación, el NPEO y el LAS pueden considerarse fácilmente biodegradables, mientras que el Findet 1618A/23, Findet 10/18 y Findet 10/15

son tensioactivos de biodegradabilidad inherente igual que los tensioactivos GCP 600 y GCP 650.

Para determinar la toxicidad de todos los tensioactivos se ha utilizado el ensayo Lumistox, que utiliza las bacterias marinas luminiscentes de la cepa *Vibrio fischeri*. Los resultados muestran que de los alcoholes grasos etoxilados ensayados el más tóxico es el Findet 1214N/16, al presentar el menor valor de EC_{50} , 1.25 mg/L, pues se trata de la concentración de tensioactivo que produce una inhibición de la bioluminiscencia de las bacterias del 50%. De los alquilpoliglucósidos el GCP 650 es el más tóxico con un valor de EC_{50} de 13.81 mg/L. El menos tóxico de los tensioactivos ensayados ha sido el Nonilfenol polietoxilado con 9.5 moles de óxido de etileno con una EC_{50} de 160.6 mg/L.

La toxicidad de los alcoholes grasos etoxilados depende de la estructura del tensioactivo disminuyendo con el tamaño de la cadena carbonada y etoxilada. También se ha establecido una correlación entre la toxicidad y el balance hidrófilo-lipófilo de los tensioactivos HLB, encontrándose que disminuye con el aumento de ambos parámetros.

También se ha medido la toxicidad durante el proceso de biodegradación. En los ensayos realizados con AGE y APG se ha obtenido una disminución importante de la toxicidad con el tiempo de biodegradación, siendo el nivel prácticamente nulo después de los 10 días del ensayo para AGE y después de los 7 días para APG. Para el tensioactivo LAS no se produce una disminución de la toxicidad durante los primeros 10 días del ensayo a concentraciones elevadas de tensioactivo (50 mg/L). El comportamiento del tensioactivo nonilfenol polietoxilado, de menor toxicidad, es diferente ya que experimenta un aumento de la toxicidad durante el proceso de biodegradación a todas las concentraciones ensayadas, lo que permite afirmar que los metabolitos producidos durante el proceso de biodegradación presentan una toxicidad superior a la del tensioactivo de partida.

1. OBJETIVOS

La Industria de detergentes y productos de limpieza en España supone una facturación total de más de 1620 millones de euros al año, que genera miles de puestos de trabajo y que produce un tonelaje anual estimado de 1.8 millones de toneladas según datos suministrados por la A.D.T.A. (Asociación de fabricantes de Detergentes Tensioactivos y Afines) (Closa, 1997). Se trata por tanto de una actividad industrial de gran volumen con una amplia diversificación de productos y con un importante impacto en la actividad económica del conjunto de la Industria Química.

Los objetivos de la presente Tesis Doctoral se enmarcan dentro de los proyectos de investigación “Formulaciones de detergentes líquidos específicos para el sector industrial agroalimentario y hostelería” (1FD97-0931), “Preparaciones enzimáticas para la degradación de residuos alimentarios” (PB98-1293) y “Formulaciones específicas de detergentes biodegradables de base enzimática” (Plan Andaluz de investigación 2002-2003), dentro de los grupos de investigación de la Junta de Andalucía “Tensioactivos, Enzimas y Emulsiones “ e “Ingeniería de Interfases y Tecnología bioquímica”.

Estos proyectos están dirigidos a desarrollar posibles formulaciones de detergentes líquidos industriales específicas para diferentes suciedades alimentarias, que sean eficaces en el lavado y en las que se eviten o atenúen los efectos nocivos medioambientales y sanitarios derivados del vertido de estos productos. Asimismo se pretende una reducción de los costes energéticos mediante la disminución de la temperatura de lavado con dichas formulaciones.

Los agentes químicos mas empleados en la industria para la limpieza, así como las amenazas o peligros que puede originar su uso y vertido a la red fluvial son los que se indican en la siguiente tabla:

Agentes químicos empleados para limpieza en la industria

Nombre de la sustancia		Amenaza /Peligro
Álcalis y Ácidos		
Hidróxido potásico		Irritante
Hidróxido sódico		Origina corrosión
Ácido fosfórico		Irritante/Origina corrosión
Ácido nítrico		Irritante/Necrosante/Origina corrosión
Ácido clorhídrico		Prob.respiración/ Irritante/Corrosivo
Acido amidosulfónico		Irritante
Secuestrantes		
Trifosfato y difosfato sódico		Eutrófico /Secuestra metales pesados
Ac. Nitrilo triacético		Eutrófico/ Secuestra metales pesados
Tensioactivos		
Aniónicos	Alquilbenzol-sulfonato	Espumas/Biodegradabilidad
	Alquilsulfato	
	Alquioxietilsulfato	
Catiónicos	Trialkilbenzilamonio halogenado	Incompatibilidad con aniónicos/presencia de cloro/biodegradabilidad
	Alquilpiridiohalogenado	
No iónicos	Alquilfenol oxietilenado	Productos tóxicos en la biodegradación

El futuro de la producción y consumo de estos productos durante los próximos años va a estar fuertemente condicionado por factores ecológicos y energéticos fundamentalmente. Al producto tensioactivo se le exigen una serie de condiciones óptimas de comportamiento en cuanto a precio, acción a baja temperatura (ahorro energético), máximo rendimiento para distintas superficies y suciedades, no toxicidad, no irritabilidad, no alteración del medio ambiente, desarrollo de la función en tiempo corto, etc. Todo esto hace que la formulación de detergentes requiera el concurso de una investigación fundamental y aplicada muy intensa.

Los detergentes industriales son productos altamente contaminantes, debido a su especial composición química. Un ciclo de lavado normal en una máquina o proceso industrial tiene una duración corta, (entre 1 y 3 minutos en el caso de lavavajillas industriales), seguido de un proceso de aclarado de unos 30 segundos. Este hecho es el responsable de que estos productos sean los más agresivos de todos los utilizados en procesos de lavado. Su agresividad supera incluso a la de los desincrustantes y desengrasantes.

El efecto de los detergentes industriales sobre las aguas residuales es lógicamente bastante intenso si se tiene en cuenta la cantidad vertida y la frecuencia con que se vierte. Esto puede ocasionar problemas de eutrofización y problemas graves para la salud como niveles elevados de cloro, que pueden producir compuestos clorados de naturaleza no bien conocida, algunos posiblemente de carácter tóxico y/ o carcinogénico o los posibles efectos a largo plazo de los detergentes sobre el organismo humano, que aunque no son suficientemente conocidos, se le atribuyen diversas acciones dermatológicas, neurológicas, cardiológicas etc.

Por otra parte, los consumidores cada vez elevan más sus exigencias sobre la calidad organoléptica y microbiana de los alimentos, las disposiciones legales son cada vez mas exigentes y los impuestos que deben soportar las industrias alimentarias sobre vertidos de aguas residuales son cada vez mayores.

Resolver todos estos problemas mediante formulaciones detergentes que sean capaces de trabajar en medios menos agresivos, que sean altamente biodegradables y que consigan una alta eficacia de lavado es actualmente un reto en el campo de las empresas que se dedican a la fabricación y comercialización de este tipo de detergentes, y serían muy bien acogidos tanto por los consumidores como por las empresas que fabrican la maquinaria específica y necesaria en el proceso de lavado.

Por todo ello últimamente se están replanteando las formulaciones actuales y se buscan otras alternativas mucho menos agresivas en sí y con el medio ambiente y que a la vez sean suficientemente eficaces tanto desde el punto de vista de la limpieza como de la desinfección, lo que ahorraría importantes cantidades de dinero a la industria alimentaria ya que con un solo paso se conseguiría el objetivo previsto (Prevost, 1998).

No obstante, las últimas tendencias que van imponiendo las empresas multinacionales, y con más incidencia Procter & Gamble, consisten en disminuir el pH, tanto en detergentes sólidos como en los líquidos. Los valores oscilan ahora entre 5 (netamente ácido) hasta 11.5, con un valor medio de 9-9.5. Las ventajas son importantes: tanto la máquina como los materiales que se lavan sufren un menor desgaste, sobre todo en cuanto a la decoración de vajillas. Los problemas de precipitación de cal y magnesio disminuyen e incluso se anulan (Brigitte, 1992; Sadlowski, 1994; Macbeath, 1994; You, 1994). Además, es posible añadir un mayor número de aditivos que mejoran la detergencia, pudiéndose conseguir fórmulas cada vez más eficaces y sofisticadas.

Las formulaciones últimas desarrolladas, por tanto, deberán cumplir una serie de requisitos como son:

- a) Los agentes tensioactivos deben ser renovables y biodegradables. Fundamentalmente alcoholes grasos etoxilados y compuestos del grupo de los alquilpoliglicósidos (obtenidos a partir de ácidos grasos y glucosa) puesto que producen metabolitos que no son tóxicos, ni cancerígenos ni mutagénicos.
- b) El pH de actuación debe estar comprendido entre 7 y 9. Con ello se pretende evitar: la precipitación de carbonato cálcico sobre las superficies a limpiar; la toxicidad del detergente y sus efectos sanitarios nocivos, la corrosión de la máquina de lavado y en consecuencia alargar su vida media.
- c) Se debe reducir al máximo el contenido en compuestos nitrogenados y eliminar totalmente los compuestos que contienen fósforo y potasio para evitar los problemas de eutrofización de los vertidos acuosos.
- d) No llevarán secuestrantes (NTA o EDTA). Estos secuestrantes complejan iones pesados como el Hg y Pb, que no pueden posteriormente eliminarse en la depuración de aguas residuales ocasionando problemas mutagénicos, ya que pueden atravesar la pared placentaria.
- e) Suprimir de la formulación la presencia de cloro activo como elemento oxidante/blanqueante ya que este elemento puede dar lugar a productos tóxicos con efectos perniciosos para la salud.
- f) Estos productos permitirán disminuir la temperatura de lavado, al ser su formulación de base enzimática, y por tanto el consumo de energía, sin perjudicar significativamente la acción limpiadora del detergente.

En la presente Tesis Doctoral como objetivo fundamental se pretende analizar y evaluar la biodegradabilidad y toxicidad de diferentes tensioactivos no iónicos comerciales: alcoholes grasos etoxilados con diferentes grados de etoxilación, alquilpoliglucósidos, Nonilfenol polietoxilado además del tensioactivo aniónico LAS ampliamente utilizado en formulaciones comerciales, con objeto de comparación. Así como el desarrollo de una metodología que nos sirva de comparación y nos permita

seleccionar un determinado tensioactivo con unas determinadas características de biodegradabilidad y toxicidad.

Los objetivos concretos marcados han sido:

El desarrollo de procedimientos analíticos simplificados y válidos para el análisis de tensioactivos aniónicos, y no iónicos que nos permitan seguir fácilmente la cinética de biodegradación y su comparación con los métodos oficiales normalizados, el Método MBAS (UNE EN 903) para tensioactivos aniónicos y el Método de Wickbold (UNE 55-725-87) para los no iónicos del tipo alcoholes grasos.

El estudio de la biodegradabilidad de tensioactivos aplicando los métodos oficiales: ensayo estático (Screening Test, OEDC, 1976), ensayo dinámico (Confirmatory Test, OEDC, 1976), método de la botella cerrada (301 D, OEDC, 1993b) y método respirométrico (301 F, OEDC, 1993b).

El análisis del crecimiento de microorganismos durante el proceso de biodegradación simultáneamente determinando las unidades formadoras de colonias en función del tiempo de biodegradación.

El efecto que sobre la biodegradación tiene la modificación de la concentración de tensioactivo y la influencia de la estructura del tensioactivo ensayado.

El desarrollo de modelos cinéticos que nos permitan determinar los parámetros característicos para el diseño de sistemas de biodegradación en estaciones depuradoras, μ_m velocidad de crecimiento específica y K_s la constante de saturación.

El estudio de la toxicidad de los distintos tensioactivos conforme a la Norma UNE-EN ISO 11348-2, con el sistema de medición LUMISTox suministrado por Dr. LANGE basado en la inhibición de la intensidad luminosa de la bacteria marina de la cepa *Vibrio fischeri* NRRL-B-11177, y el análisis de la influencia de la estructura del tensioactivo sobre la toxicidad.

La evolución de la toxicidad de los tensioactivos ensayados durante el proceso de biodegradación para detectar compuestos de biodegradación tóxicos.

Y finalmente establecer parámetros característicos de los perfiles de biodegradación, crecimiento de microorganismos y modelos cinéticos que sirvan de comparación entre los tensioactivos ensayados.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS DE LOS DETERGENTES

Los jabones, además de ser los tensioactivos de uso más extendido en el mundo, son probablemente uno de los compuestos químicos más antiguos desarrollados por el hombre, las primeras referencias datan de los Sumerios, 3000 a.C., (García, 1986), donde se habla de las propiedades curativas del azufre jabonoso. El jabón se empleaba tanto para el lavado del algodón y el lino, como para combatir enfermedades de la piel.

En la segunda mitad del siglo VIII, el jabón pasó de ser un artículo de lujo muy caro a convertirse en un producto barato y de utilización generalizada en todas las clases sociales, lo que permitió una extraordinaria mejora de las condiciones higiénicas. Se llegó a la afirmación de un hecho trascendental: gracias al uso del jabón y su repercusión en la higiene, se hizo posible el crecimiento exponencial de la población de Europa debido a la disminución de las causas de mortalidad, (Sánchez-Leal, 1995). Durante el siglo XIX la esperanza de vida del hombre pasó en Europa de los 30 a los 50 años, lo que evidentemente no sólo se debió a una mayor higiene personal, sino también a los enormes progresos médicos en la lucha contra la enfermedad y en la protección para el contagio.

Esto fue debido a los excelentes trabajos de investigación desarrollados por Chevreul sobre la estructura de aceites y grasas. Pero sin duda fue Nicolás Leblanc (1783), quien brindó a la humanidad la oportunidad de fabricar jabón a escala industrial y de crear en cierta manera la Industria Química, al abrir las puertas a las múltiples aplicaciones del carbonato sódico y, a la vez, a ese mundo fascinante de los productos tensioactivos y, en un futuro no muy lejano, al de los detergentes.

Por otra parte, la posibilidad de blanquear el algodón, fibra de aspecto gris sucio, con el descubrimiento de Tennant, por el que obtuvo cloruro de cal, permitió el desarrollo de la industria textil y la fabricación de telas teñidas.

Durante los siglos XVIII y XIX, la industria se desarrolló ampliamente fabricándose diferentes productos, en barra, en polvo, etc. En Alemania, Henkel introdujo en 1907 en el mercado, el primer detergente en polvo para lavadoras automáticas “Persil” con el incremento de la importancia de las fibras sintéticas (celulosa, acetatos, etc...). La demanda de detergentes fue más exigente, solicitándose detergentes con propiedades especiales y que fueran menos sensibles a la dureza del agua.

Dos investigadores norteamericanos, Harkins y Langmuir, descubrían casi simultáneamente en 1917 que existía una clase de sustancias sintéticas equiparables a los jabones y dotadas asimismo de la propiedad de acumularse preferentemente en las superficies de las disoluciones y en una concentración mayor que en el seno de éstas. Se explicó el comportamiento de estas sustancias por su especial estructura molecular, compuesta por un grupo polar, con afinidad por el agua, y con otro grupo apolar con afinidad por las grasas. A estas sustancias se les dio el nombre de “agentes de superficie” y más tarde el de “tensioactivos”.

También en 1917, el químico Fritz Günter de BASF consiguió con éxito la alquilación y la sulfonación del naftaleno. Esto llevó a conseguir una sustancia de alto poder espumante con buenas propiedades de mojado, y fue el primer intento de conseguir un sustituto del jabón, sin embargo, las cadenas cortas del alquilnaftaleno sulfonato no conseguían el suficiente carácter tensioactivo.

En 1928, H. Bertsch y colaboradores, utilizando un alcohol graso como materia prima, y mediante sulfatación, consiguieron la primera sustancia detergente sintética. El paso siguiente era encontrar materias primas o realizar el proceso para que fuera económicamente viable. Se asociaron diferentes compañías y desarrollaron un procedimiento para obtener alcoholes grasos de materias primas renovables. El procedimiento fue la reducción catalítica con hidrógeno, bajo alta presión de ésteres de ácidos grasos en alcoholes grasos.

La empresa Henkel en 1932 comercializó alcoholes oleico y esteárico procedentes del aceite del esperma de ballena, extendiéndolo al alcohol láurico y mirístico (C_{12} y C_{14}) respectivamente por poseer mejores propiedades.

El primer detergente formulado con sulfatos de alcoholes grasos fue introducido en el mercado por Henkel en Alemania en 1932 y por Procter & Gamble en USA en 1933. Posteriormente, fueron apareciendo en el mercado otros productos semejantes.

Por necesidades de mayor volumen de producción, aparecieron en el mercado los alquilbencenos sulfonatos (ABS): el tetrapropilénbenceno sulfonato (TBS) que en 1950 satisfacía el 60% de la demanda de detergentes en el mercado mundial. Sin embargo, en 1960, fue reemplazado por los alquilbencenos sulfonatos de cadena lineal debido a que eran más biodegradables (Kreienfeld, 1997).

En la Tabla II. 1 se muestra el desarrollo histórico de los detergentes.

Tabla II. 1.- Desarrollo histórico de los detergentes

ÉPOCA Y HECHOS CRONOLÓGICOS	OBSERVACIONES
ERA ANTES DE CRISTO	
<i>Año 3000</i> , en Sumeria	Tablilla sumeria de arcilla donde se habla de “azufre jabonoso”
<i>Año 2500</i> , en Mesopotania	Placa de arcilla con descripción de la fabricación de jabón (aceite + hierba jabonosa)
<i>Año 1500</i> , en Egipto	Grabados y papiros. Descripción (aceites animales + vegetales + sales)
<i>Año 600</i>	Introducción en Europa
ERA CRISTIANA	
Primera Generación de Detergentes	
<i>Imperio Romano</i>	Extractos de cenizas + grasas para ungüentos Fabricación con aceite de oliva y el álcalis obtenido de las cenizas de combustión de los almarjos (solanácea de las marismas del Guadalquivir)
<i>Año 800</i> , Almonas, Andalucía	Centros del negocio de fabricación de jabón período (siglos IX-XIV)
<i>Año 1000</i> , Marsella y Venecia	Desarrollo importante de la fabricación de jabón
<i>Año 1300</i> , Fundación de Gremios Europeos	Método Leblanc para la preparación del carbonato sódico
<i>Año 1791</i> , Descubrimiento de LEBLANC	Inicio de la Industria Química Obtención de cloruro de cal que permitía obtener Cl ₂ para blanqueamiento del algodón
<i>Año 1799</i> , Aportación de TENNANT	Composición de grasas y reacciones en fabricación de jabón
<i>Año 1823</i> , Trabajos de CHEVREUL	Inicio de nuevas industrias Repercusión en el incremento exponencial de la población de Europa
Segunda Generación de Detergentes	
<i>Año 1917</i> , Descubrimientos de HARKINS Y LANGMUIR	Sustancias sintéticas equiparables a los jabones. Tensioactividad
<i>Año 1925</i> , en Alemania después de la 1ª Guerra Mundial	Alquilarilsulfonatos y butilnaftalensulfonatos sódicos No precipitan en aguas duras y actúan en medios ácidos
<i>Año 1928</i> , Hidrogenación y posterior sulfatación del grupo carboxílico	Obtención de alcoholes grasos sulfatados
<i>Año 1930</i> , Condensación de ácidos grasos	Desarrollo de tensioactivos no iónicos
Tercera Generación de Detergentes	
<i>Período 1950-1980</i>	Fabricación de Mersolatos Desarrollo de los Builders Principios de la Química-Física Interfacial
<i>Año 2000- Actualidad</i>	Desarrollo de Detergentes biodegradables

2.2. EVOLUCIÓN Y TENDENCIA EN LA UTILIZACIÓN DE TENSIOACTIVOS INDUSTRIALES

En la década de los años cincuenta el clásico jabón quedó casi desplazado por los detergentes sintéticos, como consecuencia de las ventajas que estos ofrecían en el proceso de limpieza (Dorado, 1996). El mayor problema que lleva asociado la utilización del jabón, es la precipitación en aguas duras. La presencia de cationes metálicos en disolución, principalmente Calcio y Magnesio, hacen perder al jabón sus propiedades limpiadoras por la aparición de un precipitado.

Este precipitado conlleva acciones negativas en el proceso de limpieza. Origina depósitos o cercos en el producto a limpiar, resta brillo a los cabellos lavados en estas condiciones, produce manchas amarillas sobre los tejidos una vez que han sido planchados, además de un largo etcétera (Dorado, 1996).

Los detergentes sintéticos actúan sin problemas en las aguas duras, porque aunque reaccionen con los cationes metálicos presentes en ellas, forman compuestos solubles evitando las deposiciones. Además, los detergentes actúan a menores temperaturas consiguiendo excelentes resultados.

En nuestros días al hablar de tensioactivos nos referimos, en principio, a un amplio espectro de compuestos, aunque en realidad, el 80% de la demanda total mundial es hoy cubierta por un grupo reducido de productos.

Actualmente, la demanda de tensioactivos está cubierta por menos de diez tipos, siendo los alquilbenceno sulfonatos, (LABS), sulfatos de alcoholes grasos (FAS), los sulfatos éteres de alcoholes grasos (FAES), alcoholes grasos etoxilados (FAEO) y los jabones, los que ocupan las principales posiciones.

Estos tensioactivos son utilizados en distintos segmentos del mercado para la fabricación de productos de consumo (detergentes y cosméticos) y para aplicaciones industriales (alimentos, pinturas, fotografía, textiles, pieles, plásticos, etc.). Tabla II. 2.

Tabla II. 2.- Evolución y perspectiva de los tensioactivos mas utilizados (Bailón, 2003)

JABONES	En 1994, el consumo mundial total fue de 4.5 millones Tm., 2 millones Tm. se utilizaron en detergentes, la principal demanda se concentró en Asia y Sudamérica, el resto 2.5 millones Tm. se dedica la fabricación de jabón de tocador.
LABS Alquilbenceno sulfonatos	Son los principales componentes de la industria de detergentes, aunque en Latinoamérica y Asia, está permitido el consumo de alquilbenceno sulfonatos de cadena ramificada, en la mayoría de los países se sustituyen, debido a que no son biodegradables, por los alquilbenceno sulfonatos de cadena lineal.
FAS Sulfatos de alcoholes grasos	Los sulfatos de alcoholes grasos, aumentan en importancia, especialmente combinados como cosurfactantes en diferentes formulaciones, se espera que sustituyan a los jabones en Asia, lo que incrementaría su consumo y utilización en un futuro próximo.
FAES Etersulfatos de alcoholes grasos	Están experimentando una velocidad de crecimiento media en los últimos años del 4.5 %, se utilizan fundamentalmente para la fabricación de detergentes líquidos, champús y geles de baño.
FAEO Alcoholes grasos etoxilados	Experimentan un crecimiento medio anual del 4%, la razón fundamental es la sustitución de los alquilfenoles etoxilados por motivos ecológicos.

Las principales materias primas para la producción de tensioactivos son aceites y grasas, tanto animales como vegetales, y el petróleo. La producción de aceites naturales y grasas fue de 90 millones de toneladas en 1994 con un incremento del 3.7 % desde 1993.

Los alcoholes grasos y ácidos grasos que se obtienen de fuentes naturales, tienen una producción más elevada que su actual utilización, lo que supone un exceso de producción de estas materias primas. La producción de glicerina, obtenida por hidrólisis de las grasas, y utilizada en la fabricación del jabón tiene una producción constante en función del tiempo, excepto en países asiáticos.

Los ésteres metílicos de ácidos grasos, son exclusivamente obtenidos a partir de alcoholes grasos naturales y la capacidad de producción actual es de 1.2 millones de

toneladas con una demanda de 0.8 millones de toneladas. El incremento en la utilización de tensioactivos como FAS, FAES y FAEO que se obtienen de materias primas naturales hace pensar que en un futuro próximo serán los de mayor utilización con fines comerciales.

La evolución del consumo de tensioactivos (excluidos los jabones) como materia prima tal cual, en la última década (años 1993 a 2003), es la que se muestra en la Figura II. 1. Del año 1993 al 2002 se pasa de un valor de 222 millones de kg a 369 millones de kg, con un incremento del 66% durante este período (INE, 2004). No obstante, durante el período 1994-1997, el consumo disminuyó hasta un valor de 207 millones de kg. Este descenso corresponde con una crisis económica de esos años.

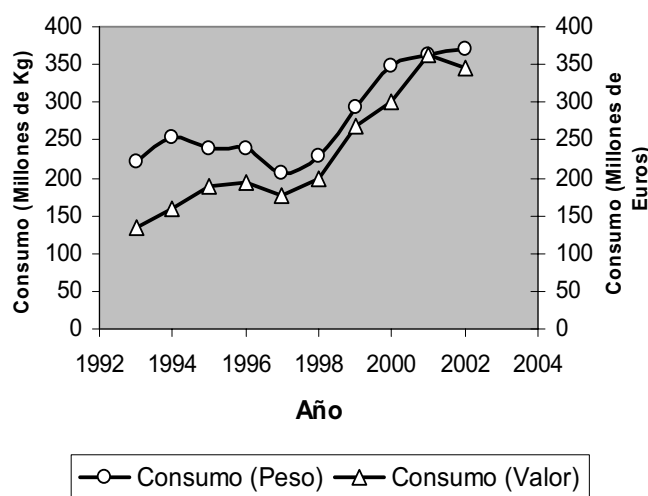


Figura II. 1. Consumo total de tensioactivos en España en el período 1993-2003

La producción mundial de tensioactivos ascendía a 17-19 millones de toneladas en el año 2000 (incluyendo jabones). Se prevé una velocidad de crecimiento global del 3-4 % anual y un 1.5-2% en la Unión Europea (Deleu, 2004). Esta velocidad de crecimiento de tensioactivos está íntimamente unida con la demanda mundial de detergentes, ya que este sector utiliza el 50% de la producción de tensioactivos.

Si descomponemos el mercado español de los tensioactivos en aniónicos, catiónicos, no iónicos y otros, según informa el INE, la evolución de cada uno de estos grupos es la que aparece en la Figura II. 2. En ella se observa un consumo oscilante de tensioactivos aniónicos, muy sensible a los ciclos económicos, sin apenas incremento en valores absolutos durante toda la década. Para el resto de tensioactivos el consumo aumenta claramente, siendo más acusado el efecto para los catiónicos que para los no

iónicos. Si tenemos en cuenta que los tensioactivos aniónicos son la base lavante de la mayor parte de los detergentes (textiles, lavavajillas manuales, limpiadores en general, geles de baño, champús, etc..) y que los tensioactivos catiónicos se aplican fundamentalmente en suavizantes (también en pequeñas cantidades en desinfectantes y en champús acondicionadores), se puede afirmar que se consume más tensioactivo en suavizar que en lavar (Bailón, 2003).

Esto implicaría una consecuencia que habría que tener muy en cuenta: los tensioactivos catiónicos, siendo biodegradables, son los más difíciles de biodegradar, por lo que pueden ser previsibles los problemas medioambientales a medio y largo plazo si la tendencia continúa así.

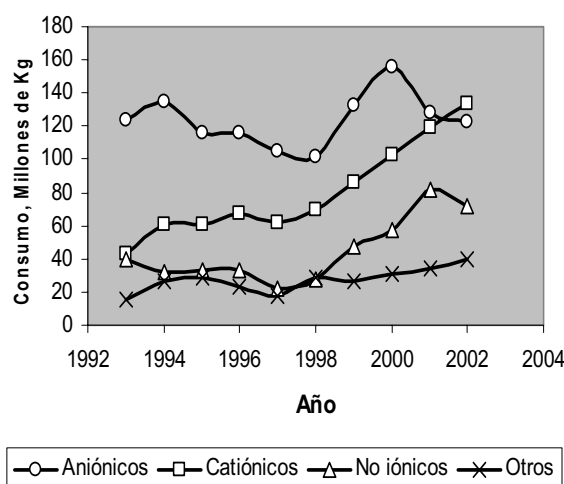


Figura II. 2. Evolución del consumo de tensioactivos por tipos

Los tensioactivos actuales pueden proceder de fuentes petroquímicas o renovables tales como aceites animales o vegetales o microorganismos, aunque hoy en día la mayoría de los tensioactivos proceden aún de fuentes petroquímicas.

Sin embargo, en los últimos años se están introduciendo en el mercado biosurfactantes producidos por microorganismos y se están desarrollando tensioactivos basados en fuentes renovables tales como los alquilpoliglucósidos que están basados en carbohidratos (Deleu, 2004). La capacidad de producción de estos tensioactivos en 1997 era de 60.000 toneladas, pero se espera que exista un incremento importante en las próximas décadas, ya que se utilizan ampliamente en diferentes sectores, pues son

biodegradables, no tóxicos, y tienen propiedades especiales respecto a otros tipos de tensioactivos.

Actualmente son numerosas las investigaciones orientadas a la obtención de nuevos tensioactivos, la razón más importante es que las principales clases de tensioactivos tradicionales tales como los etoxilados o los alquilbenceno sulfonatos, a pesar de presentar una excelente actuación como tensioactivos, exhiben en algunos casos baja biodegradabilidad y un alto potencial de toxicidad acuática. Por estas razones se prevé un importante incremento en las nuevas generaciones de detergentes incluso aunque presentasen un mayor precio en el mercado, entre ellos los alquilpoliglucósidos son los tensioactivos de mayor éxito en este momento (Holmberg, 2001).

2.3. AGENTES TENSIOACTIVOS

Las sustancias que poseen la característica de modificar las interacciones interfaciales mediante la promoción de los fenómenos de adsorción, son conocidas como agentes de superficie o tensioactivos, y están entre los productos más usuales y utilizados en la tecnología química moderna. Sus áreas de aplicación son muy extensas, casi se podría afirmar que cada aplicación industrial tiene un tensioactivo idóneo dada la gran versatilidad de este tipo de moléculas (Perales, 2001).

También la naturaleza, anticipándose a nuestro propio ingenio, presenta variadas y vitales aplicaciones de los agentes de superficie sin los cuales nuestro sistema biológico no podría funcionar, incluyendo las mismas membranas que contienen las células vivas.

Dos ejemplos de la acción de tensioactivos naturales, muy relacionadas con aplicaciones actuales, son la acción de los ácidos biliares en la emulsificación y transporte de la materia grasa en el proceso digestivo, y la acción de lubricantes pulmonares, que hacen posible el mecanismo de intercambio de oxígeno y dióxido de carbono entre los pulmones y la sangre, ya que la transferencia de oxígeno sólo es posible por la presencia de los denominados tensioactivos pulmonares. Los recién nacidos prematuros, que no tienen todavía bien formados los pulmones, deben ser tratados de forma artificial con tensioactivos para que sobrevivan (Hallman, 1993).

La estructura básica de un tensioactivo puede esquematizarse de la siguiente manera:

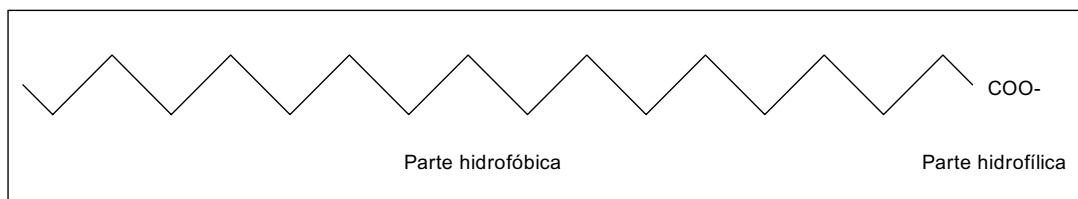


Figura II. 3.- Estructura básica de un tensioactivo (Dorado, 1996)

La parte hidrofóbica es una cadena hidrocarbonada lineal o ramificada, mientras que la parte hidrofílica es un grupo iónico o un grupo fuertemente polar.

2.3.1. PRINCIPALES FAMILIAS DE TENSIOACTIVOS

En una clasificación genérica de los agentes tensioactivos puede decirse que existen cuatro grandes grupos:

- **Tensioactivos aniónicos:** poseen grupos funcionales que se ionizan en disolución acuosa originando iones orgánicos con carga negativa y responsables de la actividad superficial. Contienen comúnmente grupos solubles, sulfatos y sulfonatos de sodio. Son los más utilizados en formulaciones detergentes en polvo para lavado de ropa y en productos líquidos para uso en lavavajillas.
- **Tensioactivos catiónicos:** poseen grupos funcionales que se ionizan en disolución acuosa originando iones orgánicos con carga positiva y responsables de la actividad superficial. Son principalmente compuestos cuaternarios de amonio. Presentan la ventaja de que son compatibles con los tensioactivos no iónicos y anfotéricos y la desventaja que son incompatibles con los tensioactivos aniónicos. Asimismo su capacidad detergente y su biodegradabilidad es baja y su coste económico es más elevado que el de los tensioactivos aniónicos y no iónicos. Se suelen usar como agentes emulsionantes a pH inferiores a 7, además presentan propiedades suavizantes y desinfectantes.
- **Tensioactivos no iónicos:** En disolución acuosa no originan iones. Poseen grupos funcionales con elevada afinidad por el agua, lo que los hace

solubles en ésta. Algunos son productos de condensación del óxido de etileno con materiales fenólicos o grasos. Son compatibles con todos los tipos de tensioactivos. Constituyen un grupo de tensioactivos de amplia y variada aplicación. En general presentan bajo poder espumante y suelen ser productos líquidos o pastosos.

- **Tensioactivos anfotéricos:** poseen grupos funcionales que pueden ionizarse en disolución acuosa confiriendo al compuesto el carácter de aniónico o catiónico, según las condiciones del medio. No se utilizan mucho como materias primas para detergentes. Algunos proporcionan una excelente espumación y bajo nivel de irritabilidad cutánea y ocular, por lo que resultan muy apropiados en las formulaciones de champú. Son compatibles con todos los tipos de tensioactivos.

Se hará mención especial a cuatro tipos de tensioactivos por ser los utilizados en este trabajo:

2.3.1.1. Alcoholes grasos etoxilados

Esta subfamilia de tensioactivos no iónicos comprende a los derivados etoxilados de los alcoholes grasos. La mayoría de estos alcoholes grasos carecen de propiedades tensioactivas debido a su insolubilidad en agua, por lo que se hacen reaccionar con polioxietileno; esto les confiere el carácter hidrofílico deseado. Los alcoholes grasos etoxilados (AGE) se obtienen a partir de alcoholes derivados principalmente de aceite de coco, de sebo o sintéticos de cadena lineal, a los que se acopla un nivel dado de moles de óxido de etileno (OE). (Figura II. 4):

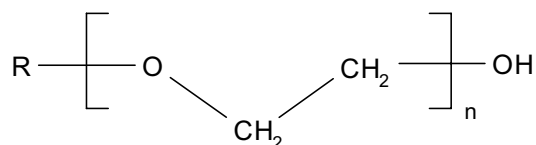


Figura II. 4.- Estructura molecular de los alcoholes grasos etoxilados

Hay que señalar que el valor “n” (número promedio de moles de óxido de etileno) que aparece en la estructura molecular no tiene por qué indicar la longitud de cadena etoxilada del compuesto mayoritario, ya que, por ejemplo, una mezcla rica en moléculas con 2 OE y cadenas con 16 OE puede tomar como valor medio 9 OE, aunque apenas existan realmente moléculas con este número de unidades de óxido de etileno.

Como resultado del método de síntesis, los alcoholes grasos etoxilados están compuestos por una mezcla compleja de oligómeros, cuya longitud media está comprendida entre 1 y 20 unidades etoxiladas. Esta distribución de oligómeros generalmente adopta una distribución de Poisson (Swisher, 1987; Pilc, 1987) y afecta a las propiedades físico-químicas, biodegradabilidad en el medio y a su uso final (Ahel, 2000; Wang, 1993).

Los alcoholes grasos etoxilados de uso comercial también son complejas mezclas de homólogos con un número par de átomos de carbono en la cadena alquílica comprendido entre 12 y 18, son los llamados alcoholes etoxilados oleoquímicos y representan un 40% de la producción total de alcoholes etoxilados. También existen los oxo-alcoholes etoxilados procedentes de olefinas lineales o de tetrapropileno. Los oxo-alcoholes lineales son mezclas de alcoholes lineales y alcoholes monoramificados con cadenas alquílicas de 11 a 15 átomos de carbono, y que constituyen el 60% restante de la producción total de alcoholes etoxilados (Marcomini, 2000).

Una característica peculiar de estos tensioactivos es que sus disoluciones en agua se vuelven turbias al calentar y acaban precipitando. Esto se debe a que a altas temperaturas el movimiento molecular rompe los hidratos. La temperatura a la que se alcanza la turbidez (temperatura de enturbiamiento, CP) depende del grado de etoxilación. Estas sustancias pueden ser líquidos o sólidos duros, dependiendo del grado de etoxilación.

Los alcoholes etoxilados se usan como emulsificantes O/W (aceite-agua) y W/O (agua-aceite). Normalmente, se usan mezclas de varios de ellos, ya que esto aumenta su capacidad para estabilizar las emulsiones. Son buenos detergentes, pero su baja formación de espumas los hace, en principio, poco atractivos en fabricación de geles o champús y especialmente aptos para formulaciones de espuma controlada. También se usan como estabilizantes aquellos compuestos que presentan mayor HLB (Balance hidrófilo-lipófilo). Asimismo, son compuestos resistentes a la dureza del agua.

En cuanto a la facilidad de eliminación de los alcoholes grasos etoxilados de las aguas residuales, en principio estos pueden ser eliminados mediante los tradicionales procesos biológicos de tratamiento, o por procesos más avanzados como son la ozonización (Brambilla, 1993) y la adsorción en carbón activo. Los alcoholes grasos lineales son degradados por hidrólisis del enlace éter, seguido de la oxidación de las dos porciones. La biodegradación primaria puede llegar a alcanzar valores superiores al 97% (Szymanski, 2000; Battersby, 2001), aunque la degradación última puede ser significativamente inferior.

2.3.1.2. Nonilfenoles polietoxilados

Los alquifenoles polietoxilados (APEO) constituyen un grupo importante de tensioactivos no iónicos desde que fueron sintetizados por primera vez en 1940. En el momento actual son los tensioactivos más ampliamente utilizados a nivel industrial y los terceros en el ranking para todos los tipos de aplicaciones, con un volumen anual de producción de $3.7 \cdot 10^5$ Tm (Raymond, 1996).

Se obtienen mediante reacciones de polimerización y condensación con óxido de etileno en presencia de un catalizador básico, normalmente un hidróxido alcalino. Su estructura se compone de una cadena alquílica, lineal o ramificada, con un determinado número de átomos de carbono, un anillo bencénico y una cadena etoxilada con “n” número de unidades etoxiladas. Figura II. 5:

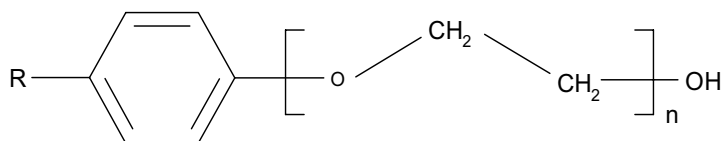


Figura II. 5.- Estructura molecular de los APEO

Como es factible en estas estructuras moleculares variar la longitud del grupo alquilo del fenol o de la cadena polietoxilada, se pueden obtener una amplia gama de productos con distintos grados de solubilidad.

Dentro de los alquifenoles polietoxilados existen dos muy utilizados: el octilfenol polietoxilado (OPEO) y el nonilfenol polietoxilado (NPEO). Los nonilfenoles polietoxilados constituyen aproximadamente el 80% de la producción, y los octifenoles etoxilados el restante 20% aproximadamente (White, 1994). La producción mundial de nonilfenoles polietoxilados está alrededor de $7 \cdot 10^5$ Tm (Jonkers, 2004).

La estructura química de los NPEO está formada por una cadena alquílica constituida por 9 átomos de carbono, un grupo aromático y una cadena polietoxilada con un número variable de unidades etoxiladas.

Como resultado del método de síntesis, los NPEO son mezclas complejas de oligómeros con distinta longitud de cadena etoxilada. Convencionalmente cada NPEO se describe mediante el número medio de unidades etoxiladas, el cual puede variar entre 1 y 100 para diferentes formulaciones, estando generalmente comprendida entre 1 y 20 unidades.

De forma general, a medida que aumenta la longitud de la cadena etoxilada, su peso específico, viscosidad y solubilidad en agua también lo hacen, siendo los NPEO con un número medio de unidades etoxiladas superior a 6 fácilmente solubles en agua.

Los NPEO han sido ampliamente utilizados durante más de 40 años en diferentes aplicaciones y sectores industriales. Tradicionalmente se han empleado en formulaciones detergentes, constituyendo la materia activa de los mismos debido a sus propiedades tensioactivas. No obstante, también desempeñan un papel fundamental en la formulación de determinados productos utilizados en: industria textil, fabricación de papel, pinturas, resinas y revestimientos de protección, aceros, plaguicidas, proceso de recuperación de aceite, etc...

De forma general las ventajas e inconvenientes de los NPEO se resumen en la Tabla II. 3:

Tabla II. 3.- Ventajas e inconvenientes de los NPEO

VENTAJAS	INCONVENIENTES
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Se emplean ventajosamente en limpiadores generales. ▪ Variando el número de moles de OE se consiguen propiedades muy diversas: baja o alta espuma, solubilizante, dispersante, emulsionante o detergente, productos turbios o transparentes, etc... ▪ Apenas si tiene incompatibilidades técnicas. ▪ Es muy flexible para formular. ▪ Su relación calidad / precio es inmejorable. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Los NPEO son considerados como una exohormona. Su presencia en el medio ambiente parece que está correlacionada con la disminución de la calidad del semen humano (Sonnenschein, 1998). ▪ Se sospecha su relación con endometriosis en las mujeres y desarreglos hormonales (Dominic, 2000). ▪ Se considera biodegradable, pero los metabolitos de biodegradación son algo más tóxicos y persistentes que el compuesto de partida (Yoshimura, 1986; Ahel, 1987; Marcomini, 2000). ▪ La toxicidad de los NPEO para la vida acuática es similar a la de otros tensioactivos, pero los productos de degradación pueden tener efectos adversos para el medio ambiente acuático, especialmente el metabolito Nonilfenol (NP) que puede ser 10 veces más tóxico que el NPEO de partida (Scott, 2000).

Como resultado del amplio campo de aplicación de los NPEO, su resistencia a la biodegradación a bajas temperaturas y la generación de algunos metabolitos persistentes durante el proceso de biodegradación, han sido identificados en todos los tipos de aguas naturales, aguas residuales y en aguas de consumo humano (Zoller 1989, Schröder, 1993). Además se ha sugerido el uso de sus metabolitos como un indicador de la contaminación industrial (Ballarin, 1989).

Como consecuencia de los problemas ambientales que presentan, determinados países tales como Gran Bretaña, Alemania y Suiza, han prohibido su uso en formulaciones domésticas, quedando restringidas sus aplicaciones al ámbito industrial. Pese a ello, son muchos los países en los que se utiliza no solo en aplicaciones industriales sino en detergentes domésticos, llegándose a casos tan extremos como los ocurridos en Israel donde se hizo necesaria la búsqueda de aguas potables en acuíferos para huir de la

presencia de NPEO (Zoller, 1989). En otros países como Estados Unidos los investigadores están menos convencidos de los efectos tóxicos de los NPEO, probablemente por las diferencias en los tratamientos de aguas residuales que resultan ser más efectivos en cuanto a eliminación comparados con Europa (Renner, 1997).

La biodegradación primaria y la última para los NPEO depende de una gran cantidad de factores ambientales. Los porcentajes de eliminación primaria van desde un 63 % (Okpokwasili, 1991) hasta casi el 100% (Patozca, 1990). La mineralización varía en un porcentaje muy bajo, y está alrededor del 90% (Manzano, 1998).

Para los NPEO el periodo de latencia es menor que para otros tensioactivos como el LAS, esto puede ser debido a que en el caso de los NPEO las enzimas son fundamentalmente hidrolíticas y están ya presentes en el medio o son sintetizadas relativamente rápido, en el caso del LAS, las enzimas son mas específicas y lleva mas tiempo el sintetizarlas (Manzano, 1998).

2.3.1.3. Alquilpoliglucósidos

Los alquilpoliglucósidos (APG) son tensioactivos no iónicos hacia los que la comunidad científica últimamente ha dirigido la vista, debido al hecho de que, además de poseer interesantes propiedades interfaciales (Nickel, 1992), exhiben excelentes propiedades ecológicas y toxicológicas (Andree, 1991). Estos compuestos se empezaron a usar como ingredientes de detergentes y productos de cosmética (Balzer, 1996) y tendrán un gran futuro si la investigación logra, al estudiar los sinergismos que aparecen al mezclarlos entre sí, optimizar sus propiedades físico-químicas.

Emil Fischer sintetizó e identificó el primer alquilglucósido en 1893, pero estos productos sólo han tenido interés académico y no fueron utilizados de manera comercial, hasta que en los años 40-50, varias compañías desarrollaron los procesos comerciales para su fabricación. Fue en 1992 cuando Henkel inauguró la primera planta en EE.UU. con una producción de 25.000 toneladas al año y en 1995 la segunda planta con igual capacidad por Henkel KgaA en Alemania.

Respecto a la síntesis industrial de estos tensioactivos cabe comentar que se ha desarrollado enormemente en las últimas décadas por la mejora del proceso de glucosidación, Fischer (1893); proceso basado en la catálisis ácida de glucosas con

alcoholes. Así, por ejemplo, en 1997 ya se alcanzó una producción total mundial de $8 \cdot 10^7$ kg (Eichhorn, 1999).

Las materias primas para la fabricación de alquilpoliglucósidos son los alcoholes grasos y distintas fuentes de carbohidratos. Los alcoholes grasos se pueden obtener a partir de fuentes petroquímicas y de fuentes naturales renovables como grasas y aceites; estos alcoholes grasos, que proporcionan al alquilglucósido la parte hidrofóbica de la molécula, se obtienen después de la transesterificación y fraccionamiento de grasas y aceites, y posterior hidrogenación de los correspondientes ésteres metílicos de ácidos grasos. Dependiendo del tipo de aceite o grasa de partida la composición del alquilpoliglucósido es distinta.

La parte hidrofílica del APG la proporciona el correspondiente carbohidrato. En el proceso de producción se pueden utilizar carbohidratos poliméricos o monómeros como materias primas, es decir, glucosa, almidón, jarabes de glucosa con bajo o alto contenido en dextrosa equivalente, etc.

Formalmente los APG se describen en términos de una estructura acetal (Figura II. 6), R representa el grupo alquílico de 8 a 16 átomos de carbono, DP es el grado de polimerización (número medio de unidades de glucosa por radical alquílico), es siempre mayor que 1 y usualmente menor que 2. Los APG tienen un grado de polimerización típico de 1.3 a 1.7.

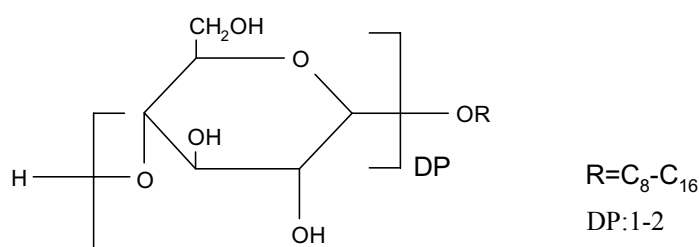


Figura II. 6.- Estructura de los Alquilpoliglucósidos

En los APG comerciales se encuentran mezclas más o menos complejas de compuestos del tipo descrito anteriormente. Estas estructuras se podrán diferenciar en el número de unidades de glucosa que presentan pero también en la longitud de sus cadena alquílicas e incluso en las posibles diferencias isoméricas de los grupos cíclicos

(configuración α o β). Es decir, los APG comerciales son mezclas complejas de homólogos e isómeros.

La adición de APG a las formulaciones detergentes mejora la estabilidad de las enzimas (proteasas, amilasas, lipasas y celulasas) durante el periodo de almacenamiento del producto (Hill, 1997).

En los sistemas tradicionales de tratamiento de aguas residuales los APG presentan un 100% de biodegradación, en condiciones metanogénicas los alquilpoliglucósidos lineales se mineralizan en un 70%, aunque los APG ramificados presentan una cierta resistencia a degradarse (Madsen, 1996).

Entre las innumerables ventajas que presentan estos interesantísimos tensioactivos destacan las que se describen en la Tabla II. 4:

Tabla II. 4.- Ventajas e inconvenientes de los APG

VENTAJAS	INCONVENIENTES
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Están basados en materias primas renovables. ▪ Presentan excelentes propiedades como tensioactivo: propiedades interfaciales (Balzer, 1996) y comportamiento de fase (Platz, 1994). ▪ Su poder espumante es mejor que para otros tensioactivos no iónicos (Steber, 1995). ▪ Son compatibles con todo tipo de sustancias. ▪ Soportan todo rango de pH. ▪ Son aplicables en detergencia textil, de superficies y cosmética. ▪ Poseen una excelente compatibilidad con la piel y las mucosas (Salka, 1993). ▪ Son los tensioactivos más biodegradables de todos los conocidos. ▪ La CMC es muy baja por lo que se necesita menor materia activa, que además se degrada muy rápidamente. ▪ Los metabolitos de la biodegradación son tan solo CO₂ y agua, no se forman metabolitos recalcitrantes durante la eliminación biológica (Steber, 1995). ▪ Presentan varios tipos de sinergismo con algunos tensioactivos aniónicos (Fornara, 2000). 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Su precio es relativamente elevado.

2.3.1.4. Lineal alquilbenceno sulfonatos (LAS)

Los lineal alquilbenceno sulfonatos (LAS) pertenecen a la familia de tensioactivos aniónicos. La materia prima para la fabricación de los LAS son los alquilbenceno lineales (LAB), los cuales son producidos industrialmente a través de procesos que difieren en su forma de alquilación del benceno. Dependiendo del proceso de síntesis, los LAB resultantes presentan diferentes distribuciones porcentuales de los isómeros de posición del fenilo a lo largo de la cadena alquílica.

Las mezclas comerciales de LAS están constituidas por conjuntos de homólogos en los que la longitud de la cadena alquílica unida al grupo fenilo oscila entre C_{10} y C_{14} (Figura II. 7). El porcentaje en que los homólogos se encuentran en las formulaciones de los LAS es variable dependiendo de la aplicación que se quiera hacer del mismo, ya que la mayor proporción de unos u otros homólogos va a acentuar una u otra propiedad físico-química que interese para su utilización.

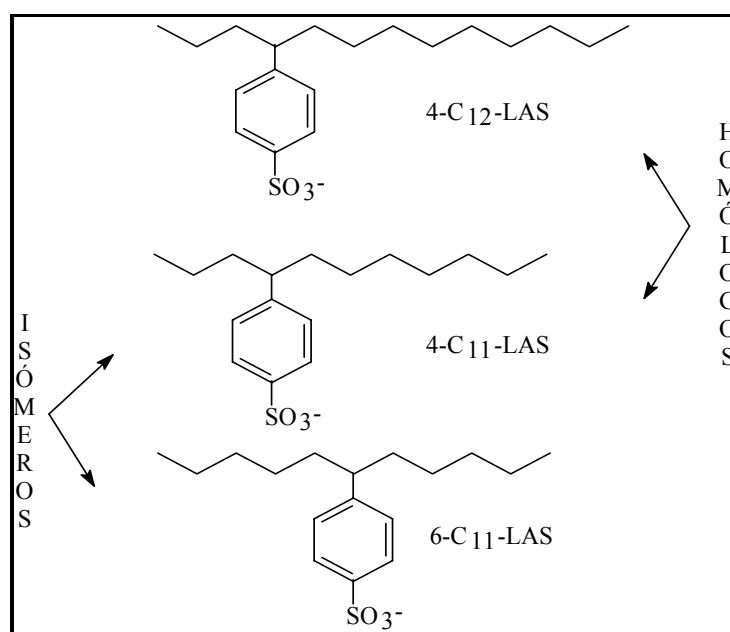


Figura II. 7.- Estructura molecular de los LAS

Cada homólogo presenta un conjunto de isómeros en función de la posición del grupo sulfofenilo sobre la cadena alquílica (isómeros posicionales); el número y

proporción de tales isómeros es un factor que va a depender de las condiciones de síntesis del tensioactivo.

El LAS es uno de los tensioactivos más utilizados en la fabricación de detergentes comerciales, las razones del aumento tan espectacular de su consumo son las que aparecen en la Tabla II. 5 (Perales, 2001) donde también aparecen sus inconvenientes.

Tabla II. 5.- Ventajas e inconvenientes de los LAS

VENTAJAS	INCONVENIENTES
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Poseen características generales de buen tensioactivo (poder dispersante, poder emulsionante, reducción de la tensión superficial, capacidad de mojado). ▪ Son muy versátiles, ya que se usan prácticamente en todos los tipos de detergentes domésticos e industriales. ▪ Son seguros en el medio ambiente a corto y largo plazo. ▪ Poseen elevada biodegradabilidad. ▪ Las materias primas requeridas para su síntesis resultan económicas. ▪ Su comportamiento en agua es bueno: para aguas con bajos niveles de dureza se comporta de forma similar al jabón, para aguas duras se comportan mejor 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Presentan menores valores de detergencia para superficies grasas que para los alquilpoliglucósidos y que los nonilfenol polietoxilados (Altmajer, 2004). ▪ Se obtienen a partir de petróleo.

2.3.2. PROPIEDADES Y APLICACIONES DE LOS AGENTES TENSIOACTIVOS

Los tensioactivos son compuestos anfifílicos (en su estructura molecular poseen un grupo afín al disolvente y otro no), pero no todos los compuestos anfifílicos se pueden considerar tensioactivos, así, el alcohol etílico es un compuesto anfifílico, pero no es un

tensioactivo. Para que un compuesto anfílico pueda ser considerado tensioactivo es necesario que posean una longitud de cadena hidrófoba de ocho o más átomos de carbono (**hidrofobicidad mínima**) y que presenten una **polaridad mínima** (relación hidrófila/hidrófoba adecuada) dependiendo de las características del grupo o grupos polares presentes. Por otro lado estos compuestos anfílicos deben presentar la posibilidad de formar **agregados micelares** para ser considerados compuestos tensioactivos.

Las propiedades fisicoquímicas de las disoluciones de tensioactivos y las propiedades relacionadas con los fenómenos de asociaciones moleculares se muestran en la Figura II. 8.

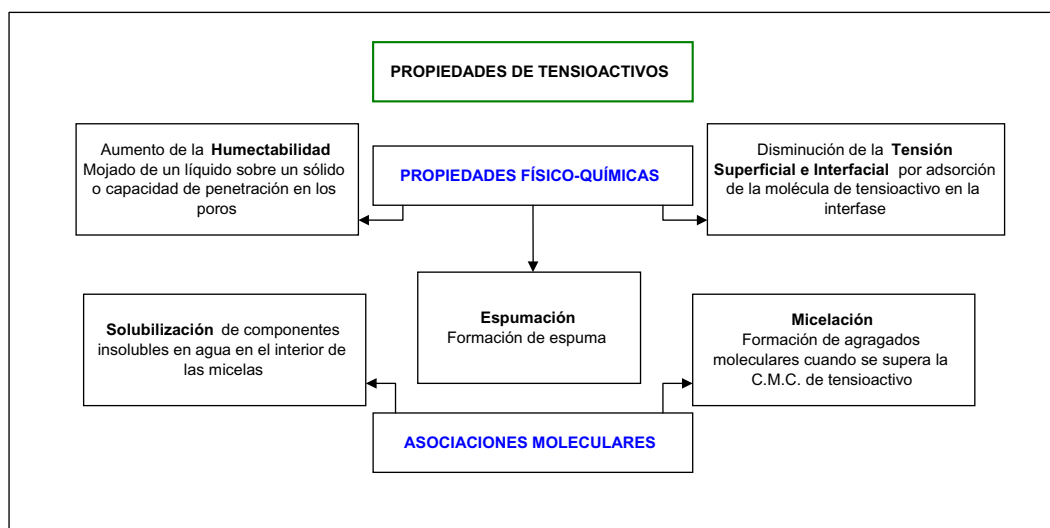


Figura II. 8.- Propiedades de los tensioactivos

Las propiedades de adsorción en superficies y de asociación moleculares determinan fenómenos relacionados con la aplicación de los agentes tensioactivos como son:

Formación de espuma: la disminución de la tensión superficial entre un líquido y el aire hace que la superficie del líquido pueda deformarse con extrema facilidad y provocar la inclusión de multitud de burbujas de aire (Hedreul, 2001).

Formación de emulsiones, microemulsiones y liposomas: cuando dos líquidos inmiscibles entre sí se encuentran en presencia de tensioactivos, uno de ellos, por efecto de la disminución drástica de la tensión interfacial, puede dividirse, mediante acción mecánica, en partículas de pequeño tamaño (del orden de algunas micras). Este sistema de

dos fases dividido en pequeñas gotitas (fase dispersa) inmersas en otra fase (fase continua) se denomina emulsión. Se reconoce por su aspecto lechoso o de crema. Es termodinámicamente inestable y con el tiempo termina separándose en sus dos fases originales (proceso de coalescencia). Cuando la fase dispersa está formada por una fase apolar y la continua es polar se dice que la emulsión es aceite en agua (O/W), y a la inversa, cuando la fase dispersa son gotitas de agua o una sustancia polar, se denomina emulsión agua en aceite (W/O).

Si la tensión interfacial es muy baja, pueden conseguirse sistemas dispersos en que el tamaño de las gotas es inferior a una micra. En este caso, el sistema es estable termodinámicamente y se denomina microemulsión. Su aspecto es translúcido o totalmente transparente y de viscosidad normalmente elevada. Las emulsiones y microemulsiones son de gran aplicación en cosmética, farmacia, tecnología de los alimentos, etcétera.

Los liposomas son estructuras complejas huecas, similares a una estructura celular, formadas artificialmente mediante un sistema agua, aceite y tensioactivo (intervienen sustancias como el colesterol, la fosfatidilcolina y la lecitina). Se caracterizan por poder transportar en su interior principios activos, y sobre todo por su capacidad de penetrar intactos a través de membranas biológicas y posteriormente liberar, una vez producida la penetración, ese principio activo. (Forgiarini, 2.002; Kunieda, 1.998; Solans, 2001).

Solubilización: si la cantidad de tensioactivo es suficientemente elevada, pueden llegarse a solubilizar de forma completa sustancias normalmente inmiscibles entre sí. En el tránsito, pueden darse no sólo disoluciones verdaderas sino que pueden formarse estructuras complejas tipo coloide o gel. En perfumería, esta propiedad es fundamental para hacer que los perfumes (aceites) puedan estabilizarse en multitud de productos comerciales que deben estar perfumados (cosméticos, detergentes, plásticos y otros objetos en general), (Edwards, 1.994; Friberg, 1.999)

Detergencia: los tensioactivos pueden hacer que partículas de suciedad dejen de adherirse a las superficies que “ensucian”, gracias a la modificación del equilibrio de tensiones interfaciales del sistema formado por el substrato (lo que está sucio), la suciedad y el baño de lavado (donde está disuelto el tensioactivo) Por esta razón, los tensioactivos son el componente principal de los detergentes (Drachev, 1.994; Prieto, 1.996; Verma, 1.998).

Transferencia de oxígeno y otros gases: otro de los efectos más interesantes de los tensioactivos es la modificación de la transferencia de oxígeno, y cualquier gas en general, a través de membranas. Dos son los sistemas que hay que destacar como muy importantes: El primero es el caso de los pulmones, ya que la transferencia de oxígeno sólo es posible por la presencia de los denominados tensioactivos pulmonares (Hallman, 1982). El otro caso es el de las agallas de los peces: cuando el medio acuoso en que viven se contamina con ligeras cantidades de tensioactivos, los peces terminan muriendo. Esta es una de las razones por las que es imprescindible que los tensioactivos sean suficientemente biodegradables para que no alcancen los ríos, lagos y mares, (Sandbacka, 2000).

Ciertas propiedades, tales como la tensión superficial, la tensión interfacial, la presión osmótica, la conductividad equivalente o la detergencia, presentan curvas especiales frente a la concentración de tensioactivo en disolución. En todos los casos hay una zona, más o menos estrecha de concentración en que la curva toma una forma singular (un mínimo, un máximo o un cambio brusco). Esta concentración se denomina concentración micelar crítica (CMC) y se asocia a la formación de unas estructuras, normalmente globulares, denominadas micelas.

Las propiedades anteriormente señaladas le confieren a los productos tensioactivos una gran versatilidad y se utilizan en multitud de aplicaciones: productos farmacéuticos, formulaciones detergentes, operaciones con metales, flotación, alimentación, etc.

En la Tabla II. 6 se muestran los diferentes campos de aplicación en diversas industrias y los tensioactivos mas utilizados en ellas (García, 1.986).

Tabla II. 6.- Campos de aplicación de los tensioactivos en la industria (García, 1986)

TIPO DE INDUSTRIA	TENSIOACTIVOS	CAMPOS DE APLICACIÓN
ALIMENTARIA	Acilglicerolos Esteres de sorbitano Copolímeros de óxido de etileno-propileno, Alquilsulfatos, Esteres de poliglicol	Emulsionantes Humectantes Antiespumantes Limpieza de instalaciones
	Nonilfenoles polietoxilados Alcoholes grasos polietoxilados Monoésteres de ácidos grasos sulfatados Alquilsulfatos Alquilnaftalensulfonatos, Lignin-sulfonatos, Aceites saturados	Humectación/penetración Desengrase Curtición Tintura Engrase Pastas de pigmento
PINTURAS, LACAS Y TINTES	Condensados de naftalensulfonato y formaldehído Alquilsulfato, Dialquilsulfosuccinato sódico, Alcoholes grasos polietoxilados, Aminas polietoxiladas	Dispersión de pigmentos Modificadores de fluidez Emulsionantes de resinas
	Alquilbenceno sulfonatos Nonilfenoles polietoxilados, Esteres fosfatados, Poliglicoles, Aceites sulfatados	Emulsificación de plaguicidas y herbicidas Humectación y dispersión Emulsiones oleosas
COSMÉTICA	Esteres de poliglicol Óxidos de amina Alcoholes grasos polietoxilados Alquilpoliéter sulfatos, Alcanolamidas, Alquilbetainas, Dialquilsulfosuccinatos	Emulsiones de cremas cosméticas Champúes, geles Jabones de tocador Solubilizantes de perfumes Emulsionantes para aceites esenciales
	Alquilbenceno sulfonatos Olefin-sulfonatos Parafin-sulfonatos Sulfatos de alcoholes grasos polietoxilados Alquil poliéter sulfatos Oxidos de amina, Alquilfenoles polietoxilados, Alcanolamidas, Sulfonatos de ácidos grasos, Sales de amonio cuaternario	Detergentes en polvo Detergentes líquidos Estabilizadores de espuma Productos limpieza de superficies duras Sanitarios Productos lavavajillas Limpiadores textiles
PAPELERA	Esteres de poliglicoles Alcoholes grasos polietoxilados Polipropilén-glicoles, Aminas polietoxiladas, Nonilfenoles polietoxilados	Agentes humectantes de la pulpa Eliminación de espuma de la pulpa Emulsionantes de ceras Reutilización del papel

Tabla II. 6.- (Continuación). Campos de aplicación de los tensioactivos en la industria (García, 1986)

TIPO DE INDUSTRIA	TENSIOACTIVOS	CAMPOS DE APLICACIÓN
PETRÓLEO Y DERIVADOS	Alquilpoliéter sulfatos Lign-sulfonatos Alcanolamidas Imidazolin, Poliglicoles, Ésteres sulfonados, Alquilbenceno sulfonatos	Solubilizantes del agua e inhibidores de corrosión Ruptura de emulsiones Dispersantes Recuperación del petróleo Eliminación de mareas negras
	Alquilbenceno sulfonatos Alcoholes grasos polietoxilados Alquilsulfatos Copolímeros óxido de etileno-propileno Amidas polietoxiladas, Dialquilsulfosuccinato sódico, Sales de amonio cuaternario	Emulsionantes para la producción de emulsiones de polímeros Agentes antielectrostáticos Modificadores de viscosidad Controladores del olor Polimerización en emulsión
PLÁSTICOS Y GOMAS	Alquilbenceno sulfonatos Nonilfenoles polietoxilados Sales de amonio cuaternario Aceites naturales polietoxilados, Alcoholes grasos polietoxilados, Esteres de poliglicol, Esteres sulfonados, Sulfonatos de petróleo	Detergentes y auxiliares de humectación Agentes antielectrostáticos Suavizantes y lubricantes Aceites autoemulsionables Jabones para limpieza en seco
TEXTILES		

La detergencia es (al menos en cuanto a tonelaje) junto a la cosmética, la aplicación principal de los tensioactivos (Deleu, 2004). La perfumería se relaciona como rama auxiliar de éstos y en menor proporción, el mercado de los alimentos y el de los fármacos.

Un detergente se define como aquel agente que es capaz de realizar una acción detergiva, es decir, que es capaz de lavar. Por ejemplo, el agua pura es un detergente, ya que por sí sola puede lavar, aún sin ser ella misma un tensioactivo. Pero no obstante, los detergentes comerciales son normalmente mezclas complejas de tensioactivos con otros aditivos: álcalis, secuestrantes de iones, dispersantes, oxidantes, blanqueantes, colorantes, perfumes, cargas, etcétera.

Otra ventaja muy importante que presentan los detergentes, es que al ser productos de síntesis, pueden ser diseñados estructuralmente para aplicaciones concretas permitiendo una gran flexibilidad en la fabricación, independientemente del diseño completo de cada formulación específica.

La Tabla II. 7 muestra composiciones orientativas de formulaciones detergentes utilizadas en textiles y superficies duras (cristales, azulejos, metales, etc.). La composición de los detergentes para el lavado de superficies duras difiere de la de textiles debido a las distintas características que se requieren para estos productos.

Tabla II. 7.- Composición de algunos detergentes (Bailón, 2003)

PRODUCTO	COMPOSICIÓN
Detergente textil lavadora	Tensioactivos aniónicos (LAS y FAS), jabones, álcalis, secuestrantes, dispersantes, blanqueantes basados en oxígeno, activadores, blanqueantes ópticos, enzimas, colorantes, perfume, cargas
Suavizante textil	Tensioactivos catiónicos, perfume, colorante
Lavavajillas manual	Tensioactivos aniónicos (LAS y LESS), tensioactivos no iónicos (Dietanolamida de coco), conservante, perfume, colorante
Limpiahogar	Tensioactivos no iónicos, tensioactivos aniónicos, glicoles, secuestrantes, perfume, colorante
Limpiacristales	Alcoholes, tensioactivos aniónicos, perfume
Lavavajillas de máquina	Tensioactivos no iónicos, álcalis, secuestrantes, dispersantes, oxidantes, colorantes.

Debido a la enorme importancia comercial de los tensioactivos se señalan las principales empresas relacionadas con estos productos (las productoras de tensioactivos, las consumidoras y las de perfumería). Figura II. 9. La producción está referida a artículos científicos publicados.

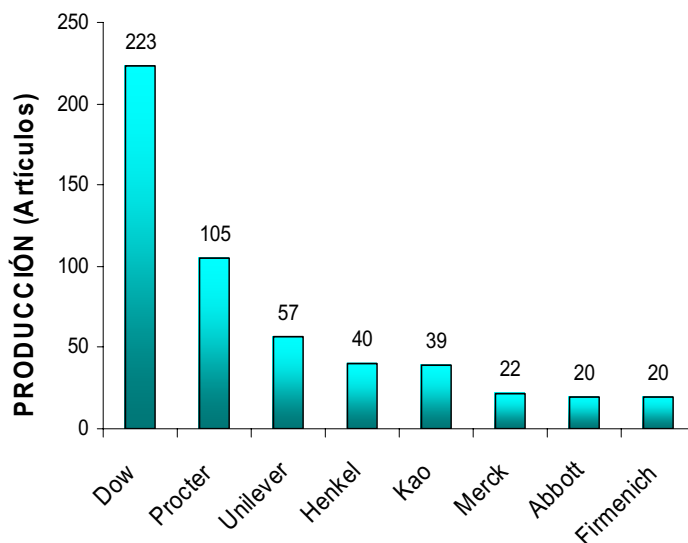


Figura II. 9.- Principales empresas relacionadas con los tensioactivos

La empresa más importante con diferencia es Dow Chemical Co. USA, dedicada a fabricar y consumir, entre otros muchos productos, tensioactivos. Tiene unas ventas de 28 millones de \$, en 170 países y 50.000 empleados. Las marcas comerciales de tensioactivos propiedad de Dow son: Ttiton®, Dowfax®, Tergitol®, Hamposyl® y Hampshire®. Igualmente fabrican productos empleados en formulaciones detergentes, tales como glicoles, poliglicoles, secuestrantes de iones, álcalis, etc. Los tensioactivos Ttritón® son de los más empleados en investigación (The Dow Chemical Company, 2004).

2.3.3. IMPLICACIONES AMBIENTALES

La gran variedad de productos detergentes comercializados, unida al incremento que experimenta su consumo, propicia un aumento de la frecuencia de incorporación de los mismos a las aguas de los vertidos domésticos e industriales, existiendo un peligro potencial de afectar negativamente a la calidad de las aguas.

La diversidad de tensioactivos comercialmente disponibles es enorme, como muestran las recopilaciones de Hollis y Ash (Hollis, 1979; Ash, 2000). Solo en los Estados Unidos hay más de mil quinientos nombres comerciales de tensioactivos disponibles: el número de compuestos relativamente puros asciende a unos setecientos (Myers, 1992) y el

resto de los productos comerciales existentes son una mezcla de una amplia variedad de agentes de superficie puros o de diferentes composiciones isoméricas de un mismo tensioactivo.

Los productos detergentes se producen a escala mundial con un considerable tonelaje y la producción total se elimina por el consumidor a través de los sistemas domésticos de canalización de aguas residuales. Por lo tanto se produce una amplia dispersión de los mismos en el entorno acuático.

Los detergentes, al ser vertidos después de su uso, pueden terminar en varias matrices ambientales, bien a través de descargas directas (sin tratamiento) o después de tratamiento en estaciones depuradoras de aguas residuales (Figura II. 10).

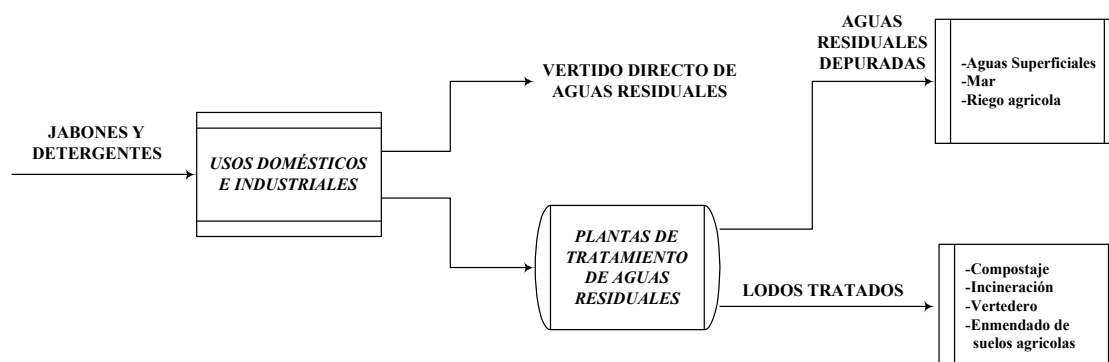


Figura II. 10.- Emisión de detergentes al medio ambiente

Los problemas medioambientales que provoca un detergente industrial, como consecuencia de su presencia en las aguas, pueden resumirse como sigue:

1. Aumento del pH de las aguas residuales a valores superiores a 12.
2. Problemas de eutrofización en cauces receptores debido a los altos niveles de fósforo procedentes del tripolifosfato, principal secuestrante de las formulaciones detergentes.
3. La sustitución de los fosfatos por otros secuestrantes como el NTA o el EDTA no evita el problema de la eutrofización y además existe un problema añadido: los iones pesados como plomo o mercurio pueden ser solubilizados entrando a formar parte del ciclo del agua, de forma que al ser ingeridos son tóxicos (llegan a ocasionar problemas mutagénicos).

4. Pueden aumentar la presencia de niveles elevados de cloro y de compuestos organoclorados de naturaleza muy dudosa; algunos posiblemente de carácter tóxico y/o carcinógeno.
5. Se requiere una cierta cantidad de oxígeno para degradar a los diferentes compuestos orgánicos que forman el detergente, lo que podría conducir a unas condiciones anóxicas peligrosas para las diferentes especies que habitan en el medio.
6. Algunos de los compuestos de la formulación presentan efectos tóxicos, tanto sobre los microorganismos como sobre los organismos superiores que allí habitan.
7. Efecto sobre la coagulación y sedimentación en plantas de depuración.
8. Contaminación de aguas subterráneas, aunque no es muy frecuente y siempre como síntoma de otra contaminación más importante.
9. Producción de espuma tanto en los ríos como en las plantas de depuración de aguas residuales.

La primera prueba de contaminación por detergentes no fue su efecto tóxico, sino la aparición de una gran cantidad de espuma en los cauces receptores. La espuma provocaba un impacto visual que degradaba el valor paisajístico del medio. Además, las aguas de pozos localizadas cerca de puntos de descarga de aguas residuales domésticas, tendían a formar espuma cuando salían del grifo. De esta forma, los tensioactivos sintéticos empezaron a hacerse notar debido precisamente a las mismas propiedades que los habían llevado al éxito: mantenían sus propiedades espumantes en aguas naturales a concentraciones del orden de partes por millón, concentraciones muy inferiores a aquellas a las que otros componentes de las aguas residuales, el jabón inclusive, pueden ser detectados visualmente (Perales, 2001).

El origen de las espumas se debía a los tensioactivos, y aunque éstos son esencialmente no tóxicos para los humanos (Sivak, 1982), y las concentraciones que normalmente se encontraban en las aguas para consumo humano son muy bajas, hay un acuerdo general sobre que su presencia en aguas potables es indeseable, aunque sólo sea desde un punto de vista estético.

Para resolver todos estos problemas, técnicos y medioambientales, hay que dirigir los esfuerzos a la formulación de un tipo de detergente que sea capaz de trabajar en medios

menos agresivos y que consiga una alta eficacia de lavado. Esto es actualmente un reto en el campo de las empresas que se dedican a la fabricación y comercialización de detergentes. La optimización (bajo parámetros medioambientales y técnicos) en el diseño de estos productos sería muy bien acogida tanto por parte de los consumidores como de las empresas que fabrican la maquinaria específica necesaria para los procesos de lavado.

Además los potenciales nuevos componentes que se incorporen a una nueva formulación detergente deberán experimentar una serie de controles analíticos tales como ensayos de biodegradabilidad y toxicidad para asegurar que sean ecológicamente aceptables. Los tensioactivos han sido objeto de una atención especial, ya que pueden inducir una relativamente elevada toxicidad sobre las especies que viven en un entorno acuático y por los problemas de espuma que ocasionan.

2.3.4. NIVELES DE TENSIOACTIVOS EN AGUAS SUPERFICIALES

Las concentraciones de tensioactivos en aguas superficiales pueden predecirse a partir de los estudios realizados en EDARs, según los datos analíticos obtenidos para las aguas depuradas y teniendo en cuenta un factor de dilución. Estos valores de concentración predichos serían solo una aproximación, ya que aguas abajo, los ríos poseen cierta capacidad para seguir degradando o eliminando compuestos tensioactivos vertidos en él. (Sánchez-Leal, 1995).

En la Tabla II. 8 se muestran datos promedio para concentraciones de tensioactivos aniónicos expresados como MBAS (sustancias activas al azul de metileno) y no iónicos expresados como BiAS (sustancias activas al yoduro de bismuto), para la entrada y salida de una EDAR de tipo biológico, así como las concentraciones promedio predecibles en los ríos a que se vierte el agua depurada, considerando un factor de dilución de 12, en puntos próximos al de vertido de dichas aguas.

Tabla II. 8.- Concentraciones medias de tensioactivos aniónicos (MBAS) y de tensioactivos no iónicos (BiAS) en EDARs y en aguas de río

TENSIOACTIVOS	DEPURADORA		
	ENTRADA, mg/L	SALIDA, mg/L	RÍO, mg/L
Aniónicos, (MBAS)	4-20	0.08-0.40	0.006-0.032
No iónicos, (BiAS)	2-6	0.10-0.30	0.008-0.025

Se observa que los valores de concentración para ambos tensioactivos en las aguas depuradas, son de un orden muy bajo, y por supuesto en los ríos son aún menores, llegando a ser en algunos casos inferiores al límite de sensibilidad del método analítico correspondiente.

En determinadas aguas superficiales pueden llegar a detectarse concentraciones de tensioactivos superiores a los indicados en la Tabla II. 8 como consecuencia de que el factor de dilución sea menor que el valor considerado de 12, o bien porque en ciertos tramos del río se realicen vertidos sin depurar o incontrolados.

Cabe destacar que durante el proceso de canalización de las aguas residuales domésticas a través de los colectores y en el trayecto hasta la propia entrada de las EDARs, tiene lugar una importante eliminación de los tensioactivos por efecto de adsorciones en sólidos en suspensión y en las propias conducciones, e incluso, por procesos de hidrólisis o degradación (Berna, 1993; Spohn, 1967; Fischer, 1984; Moreno, 1990).

En general, las concentraciones de detergentes en aguas residuales pueden oscilar entre 1-20 mg/L, y en aguas superficiales en torno a 0.5 mg/L. El sabor en agua se detecta a partir de 0.2 mg/L, y la formación de espumas a partir de 0.3 mg/L, concentraciones en agua de 2.5 mg/L afectan al crecimiento de plantas y de 5-6 mg/L son tóxicas para algas y peces en general (Martin, 1995).

2.4. BIODEGRADACIÓN. CONCEPTO Y EVALUACIÓN

Desde hace aproximadamente 40 años, el comportamiento de los contaminantes químicos en el medio ambiente se ha convertido en un tema extremadamente importante.

Se han desarrollado numerosos métodos para la investigación y vigilancia de numerosos compuestos, entre ellos los tensioactivos (Battersby, 1990). Aunque la eliminación de estos productos del medio ambiente acuático puede ocurrir mediante procesos abióticos tales como adsorción, hidrólisis y fotólisis, la conversión total de la materia orgánica en productos inorgánicos es debida a procesos de biodegradación microbiana (Swisher, 1987).

El aumento en el consumo de detergentes en los años 50 coincidió con la aparición de espuma persistente en los ríos. Debido a este hecho, se iniciaron una serie de investigaciones con el objeto de estudiar este problema. Como resultado se puso de manifiesto que uno de los principales responsables de la espuma observada en los ríos era el tetrapropileno sulfonato sódico, tensioactivo muy empleado entonces en las formulaciones detergentes. Debido a su compleja estructura molecular ramificada, no era descompuesto con facilidad por la acción biológica de algunas bacterias, es decir, no era biodegradable, por lo que conservaba sus propiedades humectantes y espumantes.

Por este motivo, se introdujo el uso de tensioactivos más fácilmente biodegradables, como el LAS. La total conversión a este tipo de tensioactivos en los países industrializados se consiguió a mediados de los años 60 y supuso una inversión de más de 150 millones de dólares en investigación y en la construcción de plantas de producción adecuadas. Sin embargo, esto no significó el fin del problema de la espuma en los ríos, puesto que ésta también se debía a causas naturales y otros productos como los de desecho de tipo proteínico.

De forma parecida, los alcoholes lineales más biodegradables han reemplazado a los alcoholes y alquifenoles de cadena altamente ramificada en la fabricación de polietoxilados no iónicos, alquilsulfatos y alquilpoliéter sulfatos para las aplicaciones de detergentes en usos domésticos.

Teóricamente todos los tensioactivos son biodegradables dándoles tiempo y condiciones apropiadas. Pero para que la acción de los microorganismos pueda solucionar el problema de la contaminación originada por estas sustancias, es preciso que se degraden fácilmente y en un tiempo relativamente corto. De aquí la división entre tensioactivos “duros” y “blandos” según su velocidad y resistencia a la biodegradación.

La **biodegradación** puede definirse de un modo simple como la “destrucción de un compuesto químico por la acción biológica de microorganismos vivos” (Swisher, 1987). Para el caso particular de los tensioactivos como moléculas a degradar, estos organismos

son los microorganismos vivos (principalmente bacterias) presentes en los diversos medios que reciben las aguas residuales, que son capaces de alimentarse de una gran variedad de compuestos orgánicos.

El proceso global que tiene lugar es una oxidación, de forma que la materia orgánica se va descomponiendo en sustancias más simples que pueden llegar a ser utilizadas por las bacterias para su metabolismo. Las bacterias están adaptadas a múltiples tipos de compuestos, debido a la relativa simplicidad de su organización y estructura, que les permite revisar y modificar sus rutas metabólicas. Debido a esta posibilidad denominada adaptación o aclimatación, las bacterias pueden llegar a vivir y propagarse incluso en sustratos como la gasolina, benceno, fenol o multitud de compuestos considerados normalmente como tóxicos.

Del concepto de biodegradación se deduce el de **biodegradabilidad**, que se puede definir como “la susceptibilidad de una sustancia a la degradación biológica”.

A la cuestión fundamental: ¿en que se descomponen los tensioactivos? podemos contestar de tres formas posibles:

1º. **Biodegradabilidad primaria**: se entiende por este concepto una oxidación o modificación de la molécula del tensioactivo, de forma que vayan desapareciendo sus propiedades tensioactivas, o bien no pueda detectarse la molécula por medios analíticos específicos. Esta pérdida de propiedades tensioactivas o de especificidad analítica, es una secuencia de pasos y no un cambio brusco. El concepto de biodegradabilidad primaria es importante, por su relación con problemas visibles, como el de espumación que puede aparecer en los ríos.

2º **Biodegradabilidad final o mineralización**: se considera la destrucción de una molécula de un compuesto químico, de forma que se convierta toda ella en CO₂, sales inorgánicas y otros productos asociados al metabolismo normal de las bacterias.

Por ejemplo, para demostrar la biodegradabilidad final de fenol, sería necesario demostrar no solo la desaparición de la respuesta analítica específica, sino también que ningún otro metabolito orgánico (biointermediato) resistente a las particulares condiciones de biodegradación se está formando. Esta tarea analítica es extremadamente difícil incluso para una sustancia tan simple como el fenol, y para ser llevada a cabo con un completo rigor científico se precisa la síntesis de material marcado con carbono-14 y una experimentación más elaborada (Perales, 2001).

En la práctica, la biodegradabilidad final es evaluada en sistemas aerobios mediante la medida del dióxido de carbono producido, el oxígeno consumido durante el proceso de biodegradación (demanda biológica de oxígeno, DBO) o mediante la medida de los niveles de carbono orgánico que permanecen en disolución a lo largo del curso de la biodegradación. Cada uno de estos métodos tiene sus problemas intrínsecos sin tener en cuenta cualquier problema experimental asociado con las medidas en sí mismas

Resumiendo, se puede decir que en los ensayos de biodegradación se realiza el análisis del tensioactivo por métodos específicos, con lo que se obtienen datos sobre la biodegradabilidad primaria, o bien se realizan determinaciones de tipo no específico (como el oxígeno disuelto, la demanda química de oxígeno, la demanda biológica de oxígeno, el carbono orgánico total, etc), con lo que se obtiene información sobre la biodegradabilidad total del tensioactivo ensayado.

3º Biodegradabilidad ambientalmente aceptable:

La biodegradabilidad ambientalmente aceptable es un tipo de biodegradabilidad primaria en la que los metabolitos resultantes del proceso de biodegradación son ambientalmente inocuos, es decir, presentan una baja ecotoxicidad. Además la extensión y velocidad resultante del proceso degradativo, debe igualar desde el punto de vista cuantitativo, la degradación de la materia orgánica residual normal en plantas de tratamiento o cauces receptores.

Muchos compuestos de interés y utilizados por el hombre son considerablemente más complejos en su estructura que simples moléculas como el fenol, el acetato sódico, etc., las cuales pueden demostrarse de un modo relativamente sencillo si se biodegradan primariamente o se mineralizan en sistemas de ensayos simples. Más aún, muchas de estas sustancias más complejas son mezclas multicomponentes como por ejemplo muchos tensioactivos de interés comercial

En estos casos pueden utilizarse experimentos biológicos junto a los experimentos de biodegradación para demostrar si el proceso de biodegradación tiene como resultado la aparición de metabolitos más o menos tóxicos que el producto original. Para el ejemplo de los tensioactivos, los cuales en general presentan una toxicidad significativa hacia organismos acuáticos como peces, algas, invertebrados, etc., hay numerosos trabajos (Kimerle, 1977; Manzano, 1999) que muestran cómo a lo largo de la biodegradación se

dan procesos tanto de aumento como de disminución de la toxicidad, dependiendo del compuesto ensayado.

Por otra parte, la OCDE, a través de su grupo de Expertos, considera otros dos nuevos términos:

Biodegradabilidad fácil o rápida (Ready Biodegradability) y **Biodegradabilidad intrínseca o inherente (Inherent Biodegradability)**. Estos dos términos se aplican, respectivamente, a un compuesto que empieza a degradarse inmediatamente después de ponerlo en contacto con una determinada población microbiana, o bien a un compuesto cuya biodegradación no empieza hasta que dicha comunidad microbiana se haya aclimatado al compuesto, lo que ocurre tras un determinado tiempo (horas, días o semanas).

Por otra parte, cabe destacar el posible error que se suele cometer en el cálculo de la biodegradabilidad, al no diferenciar entre dos fenómenos que pueden concurrir o tener lugar por separado: biodegradación y adsorción. La eliminación de un tensioactivo de un medio acuático puede ocurrir por su biodegradación o por otros medios entre los que cabe destacar la acumulación de moléculas de tensioactivo en la superficie de las bacterias (especialmente cuando la concentración de sólidos en el medio es muy elevada) o el hecho de que el tensioactivo se acumule en la interfase líquido/aire, con lo que se forma una espuma que concentra y elimina del medio a las moléculas de tensioactivo, las cuales no se verían así sometidas al proceso normal de la biodegradación.

2.4.1. EVALUACIÓN DE LA BIODEGRADABILIDAD

2.4.1.1. Ensayos de biodegradación

Para medir o evaluar la biodegradabilidad se recurre a los ensayos de biodegradación. Los tres componentes esenciales en un ensayo de este tipo para tensioactivos son: el tensioactivo, el método analítico para seguir el curso de la biodegradación, y el agente biológico (Swisher, 1987). Estos tres componentes se combinan en muy variadas formas para obtener los procedimientos de ensayo. Lo más importante en un ensayo de biodegradación es que sea un método biológicamente correcto,

que tenga en cuenta las propiedades especiales de los tensioactivos y que sea reproducible y adecuado para los trabajos de rutina. (Ruiz, 1972).

La eliminación de las propiedades de los tensioactivos de comportarse como agentes de superficie durante el tratamiento de aguas residuales ha llegado a ser un requerimiento legal. Obviamente los primeros ensayos de biodegradación fueron diseñados para que la eliminación de estas propiedades de superficie, debido a la transformación microbiana, fueran un criterio de elección en los ensayos. Aquellos detergentes que pasaban los ensayos de biodegradación, especificados en la legislación, en efecto no causaban espuma durante el tratamiento de aguas residuales ni presentaban problemas de toxicidad en los efluentes.

Durante los años 1968-1970 un grupo de expertos de la OCDE (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico) trabajó en un procedimiento de ensayo que pudiese ser adoptado internacionalmente. El procedimiento fue publicado en 1971 (OECD, 1971) y consistía en dos métodos de ensayo:

- ❖ El **ensayo estático o de selección (Screening Test)**: consiste en un ensayo con un matraz estático, es relativamente rápido y sencillo. Se considera un ensayo de aceptación y no de rechazo. En un principio se diseñó para la selección de tensioactivos aniónicos “blandos”.
- ❖ El **ensayo dinámico o de confirmación (Confirmatory Test)**: está basado en la simulación de las condiciones existentes en una planta de depuración que opera mediante fangos activados. Es un ensayo que se usa para tensioactivos que no han superado el ensayo estático y permite confirmar o rechazar los resultados obtenidos en este ensayo.

De forma general cabe hacer una distinción entre ensayos estáticos y dinámicos. Los métodos estáticos son aquellos en los que las condiciones experimentales quedan fijadas desde el principio del ensayo, y los microorganismos pasan por las distintas fases típicas de su desarrollo. En los métodos dinámicos se hacen ajustes continuos o periódicos con objeto de mantener el desarrollo de los microorganismos en fase exponencial o estacionaria; por ejemplo, alimentación de los microorganismos por una renovación periódica o continua del medio.

El rigor del ensayo estático viene determinado por la duración del ensayo, el valor de biodegradación fijado para aceptar un tensioactivo y el inóculo utilizado. El valor de

biodegradación para aceptar un tensioactivo se fijó en un 80% a los 19 días de ensayo, y la cantidad de inóculo debe ser tal que un tensioactivo aniónico “blando” (Marlon A), que es un linear alquilbenceno sulfonato, se degrade entre 90-95 % en 14 días. El nivel de desaparición de un tensioactivo aniónico “duro” del tipo tetrapropilénbenceno sulfonato debe ser al menos del 35 % durante el tiempo de duración del ensayo.

En el caso de los tensioactivos se probaron al principio, como indicadores de su presencia en el medio de ensayo, su capacidad de formación de espumas o la medida de la tensión superficial, pero sin demasiado éxito; la reactividad de los tensioactivos aniónicos con el colorante azul de metileno, resultó mas exitoso. Por tanto para estos ensayos se define el grado de biodegradabilidad como el porcentaje de eliminación de MBAS eliminado en las condiciones del ensayo.

Los dos métodos de ensayo descritos anteriormente también son adecuados para tensioactivos no iónicos, sin embargo, la principal dificultad consistía en establecer una metodología analítica adecuada. Después de diversos ensayos, el grupo de expertos de la OCDE decidió adoptar el método del tetrayoduro de bismuto de acuerdo con el método de Wickbold, expresando los resultados analíticos como mg/L de BiAS. En el caso de analizar una formulación detergente sería necesaria una prepurificación de la muestra. Estos nuevos procedimientos de ensayo fueron publicados en 1976 (OECD, 1976) para incluir los métodos analíticos de tensioactivos no iónicos.

Posteriormente se pensó que un parámetro analítico no específico para seguir el curso de la biodegradación resultaría menos costoso, además respondería a cualquier residuo o intermedio de biodegradación, indicando así la extensión de la biodegradación última del tensioactivo ensayado. El grupo de expertos de la OCDE modificó y combinó elementos del ensayo estático con otros métodos de ensayo para otras sustancias.

Se desarrollaron muchas y variadas metodologías de ensayo, pero finalmente se llegó a un acuerdo en la forma de éstos en las denominadas “Guías de Ensayos” para la degradación y acumulación de compuestos tensioactivos. Estas guías fueron elaboradas y recomendadas en 1981 (OECD, 1981). Las metodologías desarrolladas fueron posteriormente incorporadas a las Directivas de la Unión Europea para tensioactivos utilizados en productos de limpieza domésticos e industriales (CEE, 1973b CEE, 1982)

Las guías de ensayos de la OCDE abarcan tres tipos de ensayos, que se realizan en fases sucesivas, para determinar: a) biodegradabilidad fácil; b) biodegradabilidad inherente; c) comportamiento en condiciones reales (ensayos de simulación):

a) Biodegradabilidad fácil (Ready Biodegradability):

Se aceptaron cinco ensayos (son los llamados RBTs: Ready Biodegradability Tests) basados en parámetros de seguimiento de la biodegradación no específicos tales como el carbono orgánico disuelto, consumo de oxígeno o producción de CO₂. Estos ensayos tienen en común con el ensayo estático que el tensioactivo es la única fuente de carbono y que éste se expone a una cantidad relativamente baja de biomasa microbiana.

Los ensayos recomendados para esta determinación son los siguientes:

- ❑ Ensayo estático o de selección modificado (Screening Test)
- ❑ Ensayo MITI modificado (I)
- ❑ Ensayo en reactor cerrado o botella cerrada (Closed Bottle Test)
- ❑ Ensayo de Sturm modificado
- ❑ Ensayo AFNOR modificado

Todos estos métodos tienen unas características similares:

- ❖ El compuesto en estudio es la única fuente de carbono orgánico
- ❖ El medio está compuesto solo de nutrientes inorgánicos
- ❖ Inóculo de densidad celular < 10⁶/ml
- ❖ Inóculo sin pre-exposición
- ❖ Duración del ensayo inferior a 28 días: para permitir la comparación de los métodos, el grupo de expertos fijó un tiempo estándar de 28 días para la duración de los ensayos, aunque originariamente cada método tenía una duración diferente.

De acuerdo con este tipo de ensayos, se considera que una sustancia es “fácilmente biodegradable” cuando la disminución de la materia activa, tras el ensayo, es superior al 80%, o bien cuando la disminución de algún otro parámetro no específico es superior al 60-70%, esto es; COD (carbono orgánico disuelto) (70%), DBO (demanda bioquímica de

oxígeno) (60%) y CO₂ (60%). Se trata de una clasificación totalmente arbitraria de los tensioactivos que han pasado este tipo de ensayos.

Estas pruebas informan sobre la biodegradabilidad última de una sustancia en condiciones difíciles. Los RBTs son los ensayos más importantes para uso práctico aunque también los más estrictos de los publicados por la OCDE. Un resultado positivo denota que la sustancia desaparece rápidamente (Dorado, 1996). Por tanto, las sustancias que resultan biodegradables por estos métodos, se consideran que en un medio ambiente real, sufrirán una degradación rápida y fácil. Por el contrario, debido a las condiciones tan estrictas del ensayo, un resultado negativo no significa inequívocamente que la sustancia no sea degradable, sino que para asegurarse esta condición, deberían realizarse más ensayos.

Si alguna o todas las condiciones de los ensayos de biodegradabilidad fácil se suavizan, el ensayo pasa a denominarse de “inherente biodegradabilidad”. Algunos de los factores que pueden incrementar la probabilidad de la degradación son: mayores densidades celulares, pre-exposición del inóculo al compuesto ensayado, mayor duración del ensayo, reinoculación, etc...

b) Biodegradabilidad inherente (Inherent Biodegradability):

En este grupo de ensayos se incluyen:

- Ensayo SCAS modificado (Semicontinuous Active Sludge)
- Ensayo de Zahn-Wellens modificado
- Ensayo MITI modificado (II)

En los ensayos de biodegradabilidad inherente la densidad celular utilizada se encuentra en el intervalo 10⁷-10⁸ células/ml. Puesto que se considera que la biodegradabilidad inherente es una propiedad específica de un compuesto, no tiene sentido definir un límite de duración del ensayo. Datos en torno al 20 % de disminución de la materia activa tras el ensayo, pueden considerarse como evidentes de una biodegradación inherente primaria, y datos superiores al 70% en la disminución de parámetros no específicos (consumo de oxígeno, carbono orgánico disuelto, etc...) son indicativos de una biodegradación inherente total.

Las pruebas de biodegradación inherente también permiten calcular la formación de compuestos intermedios. Estas pruebas indican si en condiciones óptimas una sustancia

tiene el potencial de biodegradarse, y un resultado positivo indica que la sustancia no persiste indefinidamente (Dorado, 1996). Si una sustancia no posee biodegradación inherente se considera no degradable (a menos que se degrade abióticamente).

c) Pruebas de simulación:

Dentro de este tipo de ensayos, encaminados a conocer el comportamiento de un tensioactivo en condiciones ambientales reales, cabe destacar:

- Ensayo dinámico o de confirmación modificado (Confirmatory Test)
- Ensayo del “Porous Pot”

De acuerdo con los datos que se obtengan en este tipo de ensayos, se considera que un tensioactivo es totalmente biodegradable en una EDAR con fangos activados, cuando su porcentaje de eliminación del carbono orgánico disuelto sea superior al 70%.

En 1981 se llevaron a cabo una serie de estudios comparativos de los RBTs para 44 compuestos diferentes encontrándose diferencias significativas en cuanto a su severidad o rigor. El ensayo más estricto fue el ensayo en reactor cerrado seguido de: ensayo MITI (I), ensayo estático modificado, ensayo AFNOR modificado y ensayo de Sturm modificado. Estos dos últimos ensayos son los menos estrictos debido a que utilizan una concentración de inóculo varios órdenes de magnitud superiores.

En 1985 comenzaron a revisarse las guías de ensayo publicadas en 1981, en especial lo referente a los RBTs (301A-301E) en el sentido de armonizar todos los ensayos y para adoptar un ensayo adicional que fuese adecuado para compuestos poco solubles, se propuso un ensayo de respirometría manométrica como una simplificación del ensayo MITI (I). 37 laboratorios participaron en un ensayo interlaboratorio para comprobar la validez de los métodos propuestos.

Finalmente en 1993 la OCDE (OECD, 1993b) publicó una nueva guía de ensayos para biodegradabilidad fácil que contenía seis métodos: COD Die-Away, evolución de producción de CO₂, ensayo estático modificado, respirometría manométrica, ensayo en reactor cerrado y ensayo MITI (I). El medio mineral utilizado es similar en los cuatro primeros ensayos, y la máxima concentración de inóculo permitida varía en un rango de dos órdenes de magnitud para todos los ensayos si no se considera el ensayo estático modificado.

Además de las condiciones expuestas, otra condición arbitraria que se debe cumplir, es que la degradación del compuesto ensayado debería tener lugar dentro de los 10 días siguientes al comienzo del ensayo (14 días para el ensayo en reactor cerrado), considerando como comienzo de la degradación aquel momento en el que desaparece el 10% del sustrato adicionado. Es el llamado criterio “10 days-window” o principio de los diez días. Este criterio está siendo cuestionado por numerosos investigadores y se presenta como inadecuado para clasificar un compuesto como “fácilmente biodegradable” en especial para mezclas comerciales y compuestos de escasa solubilidad (Richerich, 2001). En la última legislación europea (COM, 2002) ya se considera como un principio no deseable. La concentración de compuesto y el inóculo es menos favorable en el ensayo estático modificado que en los otros ensayos, por lo tanto los efectos tóxicos reducen su aplicabilidad.

Algunos de los RBTs revisados en 1993 resultan muy apropiados para medir la biodegradabilidad última. El método en reactor cerrado resulta útil para tensioactivos aniónicos y no iónicos de buena solubilidad. En 1994 Struijs (Struijs, 1994) hizo un estudio comparativo entre los nuevos RTBs y el ensayo estático de la OCDE, y observó que en el ensayo en reactor cerrado las condiciones para la biotransformación de un tensioactivo son similares o incluso más favorables que en el ensayo estático, ya que la concentración de inóculo es diez veces mayor y la duración del ensayo se prolonga de 19 a 28 días. Se concluyó que los RTBs revisados deberían considerarse como métodos complementarios más que como meros sustitutos del ensayo estático y dinámico. Por otra parte la aplicación de los RTBs constituye una doble selección para distinguir entre tensioactivos que son fácilmente mineralizables y aquellos que son rápidamente convertidos en intermedios estables. Por tanto se propone un sistema de ensayos de doble selección: el ensayo estático de la OCDE y un ensayo adecuado de entre los RTBs revisados.

En la misma época en la que se publicaron los RBTs revisados de la OCDE se crearon una serie de ensayos estándar de biodegradabilidad por la Organización Internacional para la Estandarización (ISO), ensayos que son bastante similares a los creados por la OCDE.

En la Tabla II. 9 se presenta una lista de métodos para la determinación de la biodegradabilidad total.

Tabla II. 9.- Lista de métodos para determinar la biodegradabilidad total (mineralización) de compuestos (Karsa, 1995)

A. Métodos revisados de la OCDE (fácil biodegradabilidad)
301 A COD Die-Away
301 B Evolución en la Producción de CO ₂ (Test de Sturm modificado)
301 C Ensayo MITT ^c (I) (DBO)
301 D Ensayo en Reactor Cerrado (DBO)
301 E Ensayo estático de la OCDE Modificado (COD)
301 F Respirimetría Manométrica (DBO)
B. Métodos de ensayo de la Unión Europea (fácil biodegradabilidad)
C3 Ensayo estático de la OCDE modificado (COD)
C4 Ensayo AFNOR modificado (NF T90/302) (COD)
C5 Ensayo de Sturm modificado (CO ₂)
C6 Ensayo en reactor cerrado (DBO)
C7 Ensayo MITT ^c (I) modificado (DBO)
C8 Demanda bioquímica de oxígeno (DBO)
C. Métodos de la Organización Internacional para la Estandarización (ISO)^a
ISO 7827 Método mediante análisis de carbono orgánico disuelto
ISO 9408 Método mediante respirometría (demanda de oxígeno)
ISO 9439 Método mediante producción de CO ₂
ISO/CD 10,707 Método en reactor cerrado (aún sin implantar)
ISO/CD 10,634 Guía para sustancias insolubles
D. Métodos de la OCDE (inherente biodegradabilidad)
302 A Ensayo de lodos activos en discontinuo (SCAS) modificado (COD)
302 B Ensayo Zahn-Wellens-EMPA ^b modificado (COD o DQO)
E. Métodos de la Unión Europea (inherente biodegradabilidad)
Ensayo SCAS modificado
Ensayo Zahn-Wellens modificado
F. Métodos de la Organización Internacional para la Estandarización (ISO)^a
ISO 9887 Ensayo SCAS
ISO 9888 Ensayo Zahn-Wellens
G. Métodos de la OCDE (simulación)
303A Tratamiento aerobio de aguas residuales (COD)
H. Métodos de la Unión Europea (simulación)
Ensayo de simulación de lodos activos (COD)
I. Métodos de la Organización Internacional para la Estandarización (ISO)^a
ISO/TC147/SC5/WG4 N140 Ensayo de simulación de lodos activos (COD)

^a no se diferencia entre ensayos de fácil o inherente biodegradabilidad

^b EMPA: Laboratorios Federales Suizos para el Ensayo e Investigación de materiales

^c MITI: Ministry of International Trade and Industry (Japón)

2.4.1.2. Técnicas analíticas para el seguimiento de la biodegradación

Para la estimación del progreso y la extensión de la biodegradación de un tensioactivo en el sistema bajo observación, existen multitud de métodos analíticos. Estas técnicas pueden hacer uso de propiedades físicas o químicas del propio tensioactivo o de sus intermedios de biodegradación. También es posible medir funciones relacionadas tales como la cantidad de oxígeno consumido o el CO₂ producido por los microorganismos. Cada uno de los métodos analíticos tiene ventajas para su aplicación, pero ninguno de ellos está exento de limitaciones (Swisher, 1987). Muchos de estos métodos no son aplicables a concentraciones excesivamente pequeñas (0.1-10 mg/L), concentraciones de interés en investigación ambiental y en ensayos de biodegradabilidad.

Métodos físicos o no específicos:

Se basan en la medida de alguna propiedad física del sistema que contiene al tensioactivo, tales como la formación de espuma o la disminución de la tensión superficial. Se les denomina métodos no específicos por no distinguir entre los tensioactivos aniónicos, catiónicos o no iónicos. Revelan concentración de tensioactivos en el intervalo entre 0.1 y 100 ppm (Swisher, 1987).

Métodos químicos o semiespecíficos:

El principio de los métodos químicos consiste en la formación de un compuesto o complejo con el tensioactivo para extraerlo (por transferencia de fases o precipitación), seguido de una determinación colorimétrica o espectrofotométrica.

El principal inconveniente que presentan estos métodos es la baja sensibilidad a los oligómeros de menor cadena carbonada (Sivak, 1982; Patoczka, 1990).

A diferencia de los métodos físicos, los químicos distinguen entre las distintas clases de tensioactivos, aniónicos, catiónicos y no iónicos, pero dentro de cada clase no se distingue al tensioactivo concreto de que se trata, por lo que también reciben el nombre de semiespecíficos.

Métodos físico-químico o específicos:

Son las técnicas instrumentales, basadas en la aplicación de técnicas físico-químicas, permiten distinguir entre los tensioactivos de una misma clase y determinar los diversos componentes (oligómeros, isómeros...). Las técnicas cromatográficas han resultado de gran utilidad por su selectividad, sensibilidad y versatilidad. La cromatografía líquida y gaseosa de alta resolución son actualmente las técnicas de uso más extendido en el análisis específico de tensioactivos, aunque también existen otras como espectroscopia de infrarrojos, espectroscopia ultravioleta y técnicas traza.

Métodos metabólicos y otros métodos no específicos

Algunas de estas técnicas son: DQO, DBO (técnicas de botella cerrada, respirometría), CO₂, crecimiento bacteriano y toxicidad.

Merece especial importancia la toma de muestras en los ensayos de biodegradabilidad. A causa de la capacidad de los tensioactivos de adsorberse en las superficies y sólidos en suspensión, es necesario extremar las precauciones a la hora de obtener muestras representativas para su posterior análisis. Una precaución en la toma de muestras es tomar ésta exenta de espuma así como rellenar completamente el recipiente de la muestra. En el caso de que se tomara una alícuota de la muestra, el recipiente debe someterse a una cuidadosa agitación con un agitador magnético o invertir el recipiente hasta mezclar bien el contenido.

En la mayoría de los ensayos de biodegradabilidad las muestras a analizar contienen cierta cantidad de sólidos, suspendidos o no. Si se hace necesaria la separación, es conveniente centrifugar la muestra en lugar de filtrar (Karsa, 1995). Si se utilizara la filtración se aconseja rechazar los primeros 10-20ml de filtrado obtenidos con objeto de minimizar la adsorción del tensioactivo en el material filtrante. La conservación de muestras antes de ser analizadas puede hacerse mediante la adición de mercurio, formaldehído, o mediante congelación.

A continuación se describen de forma general los principales métodos de análisis para medir biodegradación primaria para tensioactivos aniónicos y no iónicos, que son las clases de tensioactivos estudiados en este trabajo.

En el caso de los **tensioactivos aniónicos**, cuando se desea conocer el nivel de tensioactivos aniónicos totales en aguas residuales, el método analítico oficialmente reconocido es:

- *Azul de Metileno* o MBAS (Sustancias activas al Azul de Metileno). Este método está basado en las modificaciones de Abbott (Abbott, 1962) del método de Longwell y Maniece (1955). Permite medir un rango de concentraciones de 0.1-2.0 mg/L para 100 ml de muestra. El límite de detección está en 0.02-0.05 mg/L. Es el método colorimétrico más usual para determinación de tensioactivos aniónicos. El tensioactivo aniónico reacciona con un colorante catiónico para formar un par iónico que se extrae bajo condiciones controladas de pH y agitación, finalmente se realiza una medida espectrofotométrica. La especificidad del método es baja: todos los sulfatos y sulfonatos utilizados en preparaciones comerciales reaccionan positivamente. El método del azul de metileno para tensioactivos aniónicos ha sido oficialmente adoptado en Europa (CEE, 1982a; OEDC, 1976).
- *Métodos cromatográficos*: TLC (cromatografía de capa fina), GC (cromatografía gaseosa) y HPLC (cromatografía líquida de alta resolución).

En el caso de los **tensioactivos no iónicos**, los tensioactivos comerciales con un grupo etoxilado (representan el grupo mas importante de tensioactivos no iónicos) no son entidades moleculares individuales, están formados por un elevado número de homólogos y oligómeros, por tanto la determinación analítica de tensioactivos no iónicos a bajas concentraciones resulta mas complicada que para tensioactivos aniónicos y catiónicos en tres sentidos: los tensioactivos polietoxilados incluyen una gran variedad de sustancias químicas, las interferencias con otros materiales en muestras ambientales resultan mas complicadas, los intermediatos de biodegradación no se identifican tan claramente como el tensioactivo de partida. En muchas ocasiones se requiere una purificación de las muestras en muestras ambientales. Los métodos que se aplican comúnmente al análisis de estos tensioactivos son:

- *Yoduro de Bismuto*, BiAS o Método de Wickbold (Wickbold, 1972; Waters, 1986). Es el método oficial europeo (CEE, 1982b; OEDC, 1976) para

análisis de tensioactivos no iónicos etoxilados en general, expresándose como contenido en BiAS (Sustancias activas al yoduro de bismuto).

- *Cobaltotiocianato* o CTAS (Crabb, 1964).
- *Métodos cromatográficos*: TLC (cromatografía de capa fina), GC (cromatografía gaseosa) y HPLC (cromatografía líquida de alta resolución).
- *Método propuesto por la American SDA* (Matthijs, 1991).
- *Método europeo normalizado* para la determinación de tensioactivos no iónicos (Matthijs, 1991).
- *Potasio picrato* o PPAS.

2.4.2. VARIABLES QUE INFLUYEN EN LA BIODEGRADACIÓN

En un ensayo de biodegradabilidad intervienen numerosas variables que pueden tener gran influencia en el resultado final obtenido como son: los microorganismos (tipo, aclimatación, concentración), el medio de cultivo (tipo, concentración), oxígeno, temperatura, pH, luz, la concentración del propio tensioactivo y el método analítico utilizado.

Los microorganismos que se utilizan en los métodos de ensayo de la biodegradabilidad deben ser del tipo de los que realmente se encuentran en las aguas de río, agua de mar, aguas residuales y en los procesos de depuración (autodepuración y tratamiento biológico en plantas depuradoras), de esta forma los resultados que se obtengan de los ensayos pueden ser extrapolados a la realidad. Aunque son numerosos y variados los microorganismos existentes en estos medios, las bacterias forman la mayor parte de su población por desarrollarse mejor y más rápidamente que otros microorganismos.

La experiencia indica que los mejores resultados en los ensayos de biodegradación se obtienen con un inóculo polivalente de diferentes especies (Swisher, 1987) ya que las poblaciones mixtas proporcionan más información para la predicción del comportamiento de un tensioactivo en un medio natural real. Las especies puras son apropiadas en los estudios de biodegradación en que se quieran aclarar los mecanismos o secuencias de reacciones de la oxidación biológica (Ruiz, 1972). Además, la concentración bacteriana es

un factor muy importante en los ensayos de biodegradabilidad, ya que afecta a la velocidad de degradación, al período de aclimatación, y por consiguiente al tiempo total de la degradación. Cuando la relación de bacterias a tensioactivo disminuye, el período de adaptación aumenta y la velocidad de degradación disminuye (Ruiz, 1972).

En los métodos de ensayo de fácil biodegradabilidad de la OCDE se hace alusión sobre los siguientes aspectos; el inóculo debe provenir del medio ambiente, la densidad celular está limitada a alrededor de 10^6 células/mL en el medio de ensayo y el pretratamiento no debe incluir una pre-exposición del inóculo al compuesto a ensayar. En los métodos revisados de la OCDE se admite un pre-acondicionamiento, lo que permite a los microorganismos aclimatare a las condiciones del ensayo elegido.

Puesto que los tensioactivos se usan principalmente en medios acuosos, los ensayos más importantes son los que ocurren en este medio. Ya que los métodos de ensayo de biodegradabilidad suelen representar o simular en el laboratorio las condiciones naturales, se debe utilizar en los ensayos agua de río, mar o agua residual. Sin embargo, si se quieren obtener ensayos reproducibles se recomienda el uso de aguas sintéticas a base de sustancias orgánicas que suministren los elementos necesarios. En algunos casos se utilizan mezclas de medio natural y sintético y en otros casos medios sintéticos que reproducen condiciones naturales y donde el detergente es la única fuente de sustancia orgánica, o bien va acompañado de otros nutrientes orgánicos que sirven para ayudar al normal desarrollo de los microorganismos.

Puede ocurrir que, dependiendo del tipo de compuestos y la concentración en el medio, las bacterias inicien su metabolismo a base de otro compuesto orgánico más asequible y no degraden la molécula de tensioactivo hasta que dicho compuesto haya desaparecido prácticamente, con lo que la degradación del tensioactivo se retarda de forma sensible. Igualmente puede ocurrir que los nutrientes presentes en el medio acúen como agente bacteriostático o bactericida, e incluso comportarse como uno u otro dependiendo de las condiciones del ensayo.

La presencia de oxígeno libre en el medio es fundamental para el desarrollo de los microorganismos aerobios, que lo utilizan como agente oxidante de los sustratos orgánicos. En los métodos de ensayo y estudios de biodegradación en medio aerobio, el medio se airea por agitación o por paso de una corriente de aire, en ningún caso se introduce oxígeno puro, ya que puede afectar al desarrollo de los microorganismos por pérdidas de las pequeñas, pero necesarias, cantidades de anhídrido carbónico disuelto en el medio.

Además es muy importante la relación existente entre el oxígeno disuelto disponible en el medio y el tensioactivo, ya que éste puede impedir el paso del oxígeno del aire al medio de ensayo, esto es importante sobre todo en las superficies estáticas, debido a que el tensioactivo se adsorbe en las paredes. Otro efecto importante es la adsorción del tensioactivo en las membranas exteriores celulares de los microorganismos afectando de esta forma su permeabilidad al oxígeno.

El intervalo de temperaturas dentro del cual pueden crecer y desarrollarse los microorganismos es relativamente amplio, sin embargo, para cada organismo en particular, este intervalo es pequeño. El aumento de la temperatura en los ensayos de biodegradación lleva consigo una disminución del período de latencia o tiempo de adaptación. Igualmente influye sobre la concentración limitante, pues aunque las curvas de degradación en función del tiempo sean análogas, los valores de esta concentración aumentan con la temperatura. Por lo general, se suelen usar temperaturas en los ensayos de biodegradabilidad del orden de 20-25 °C.

La mayoría de las bacterias se adaptan y desarrollan dentro de intervalos de pH relativamente amplios, sin embargo, existen algunos microorganismos cuyo desarrollo se inhibe en medios ácidos o alcalinos. Este factor no tiene importancia en los estudios de biodegradación, ya que éstos se llevan a cabo, generalmente en medios neutros o ligeramente alcalinos, que son los más representativos de los medios naturales contaminados. Sin embargo, se observa en los métodos de ensayo de laboratorio una cierta tendencia del medio a cambiar hacia pH ácido como consecuencia de los cambios químicos debido al desarrollo de la población bacteriana. Para amortiguar los cambios excesivos de pH a veces se añaden al medio soluciones tampón.

La luz tiene una influencia apreciable para el desarrollo de los microorganismos, siendo esencial para ciertas especies de bacterias (fotosintéticas). Por lo general, en los métodos de ensayo de la biodegradabilidad se recomienda la oscuridad o luz difusa.

Concentración inicial de tensioactivo

Si una sustancia es utilizada por los microorganismos como sustrato, éstos solo se desarrollan propiamente dentro de los límites específicos de concentración. A concentraciones muy bajas de sustrato, la velocidad de desarrollo es generalmente lenta, pero aumenta progresivamente a medida que se incrementa su concentración. Por encima

de un cierto límite, la velocidad de crecimiento se hace constante e independiente de la concentración.

La concentración de tensioactivo en el medio de ensayo es siempre del orden de partes por millón (mg/L) y suele ser análoga, o ligeramente superior, a la concentración normal en aguas receptoras o residuales, de acuerdo con el método de ensayo empleado. La concentración normal en efluentes urbanos suele estar en el intervalo 10-20 mg/L. En los ensayos que simulan condiciones naturales de aguas receptoras la concentración suele ser de 5 mg/L. En cualquier caso, el límite inferior de concentración vendrá dado por la sensibilidad del método analítico que se utilice y por la precisión que se desee en los resultados. La concentración máxima dependerá en cada caso del posible efecto tóxico o inhibidor del tensioactivo que pueda afectar al desarrollo de los microorganismos.

Al aumentar la concentración de tensioactivo se observa un aumento significativo del período de adaptación y una disminución de la velocidad de degradación. Este hecho puede ser debido a un efecto de interacción bacteria-tensioactivo o a una disminución de la solubilidad del oxígeno disuelto en el medio (Ruiz, 1972; Swisher, 1987).

Existen muchos ejemplos en bibliografía en los que se muestra como diversos compuestos en concentraciones iniciales entre 20-100 mg/L presentan efectos inhibitorios sobre su propio proceso degradativo, pero se degradan a concentraciones más bajas.

Dobarganes (Dobarganes, 1975), realiza ensayos de biodegradación a escala de laboratorio con alquilfenoles polietoxilados, demostrándose la influencia de las variaciones de concentración del tensioactivo en los resultados de degradación obtenidos. Se comprueba la existencia de un aumento significativo del período de inducción conforme aumenta la concentración, llegándose a concentraciones de tensioactivo donde este efecto es muy pronunciado.

En los ensayos convencionales (fácil e inherente biodegradabilidad) la concentración del compuesto a ensayar debe ser lo más baja posible, siempre acorde con los límites de detección del método analítico empleado como se ha indicado. Una orientación para compuestos inhibidores, dada por la OCDE, es que la concentración inicial (para lodo activo) debería ser de alrededor del 10% del valor de la EC_{50} (concentración que provoca efecto sobre el 50% de la población ensayada) cuando este valor es del orden de 300 mg/L, mientras que para compuestos más inhibidores, habría que realizar ensayos de biodegradación con un rango de concentraciones iniciales.

En cualquier caso, las condiciones del ensayo de simulación adoptadas han de ser consideradas a la hora de interpretar y extrapolar los resultados obtenidos.

2.4.3. MODELOS CINÉTICOS DE BIODEGRADACIÓN

2.4.3.1. Introducción

El conocimiento de la cinética de biodegradación es esencial para evaluar la persistencia de contaminantes orgánicos como los tensioactivos y para valorar los riesgos de exposición en humanos, animales y plantas, además es útil para el diseño de plantas o equipos industriales que permitan eliminar estos productos.

La cinética de biodegradación es enormemente importante porque permite conocer la concentración de tensioactivo en cualquier instante, permite la predicción de niveles probables en un tiempo futuro, y permite la evaluación de si el compuesto será eliminado antes de ser transportado a un compartimento ambiental al que las personas, animales o plantas podrían estar expuestos.

Tradicionalmente el estudio de la cinética de biodegradación se ha centrado en dos aspectos; en primer lugar, la evaluación de factores que afectan a la cantidad de tensioactivo transformado por unidad de tiempo, tales como temperatura, pH, otras fuentes de carbono, etc...y en segundo lugar, la determinación de la forma de la curva que describe la biodegradación y la evaluación de cuál es el modelo de biodegradación que mejor ajusta el metabolismo del compuesto estudiado.

Sin embargo, la velocidad y forma de la curva de biodegradación de tensioactivos depende de muchos factores: del compuesto que se biodegrada, de su concentración, de las condiciones mantenidas durante el ensayo, de los organismos responsables del proceso, y de una enorme variedad de factores ambientales (Alexander, 1994), por lo que establecer un modelo cinético general es una tarea complicada.

El desarrollo de modelos cinéticos de biodegradación para los productos tensioactivos es de vital importancia para la predicción de los niveles de contaminación de estos compuestos así como para el análisis de la influencia de las distintas variables del proceso sobre la velocidad de biodegradación (Battersby, 1990).

Los ensayos de biodegradación actuales propuestos por la OCDE no recogen un tratamiento cinético preciso de los datos, tan solo proporcionan el porcentaje de eliminación de un compuesto después de un periodo dado. En los protocolos de estos ensayos, los únicos parámetros cinéticos que se contemplan son el tiempo de vida media y el periodo de latencia. Ambos son calculados mediante métodos gráficos sobre la curva de degradación (Figura II. 11).

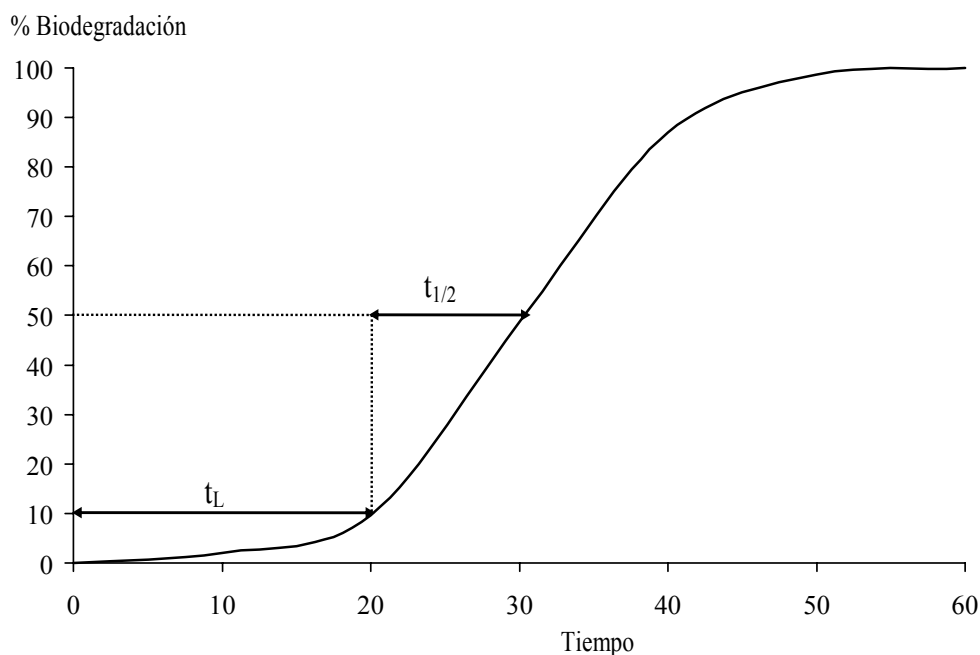


Figura II. 11.- Curva típica de biodegradación de un ensayo de biodegradación en discontinuo

El tiempo de latencia (t_L) es considerado como el periodo que transcurre hasta que se alcanza un 10% de biodegradación, mientras que el tiempo de vida media ($t_{1/2}$) es considerado como el tiempo que pasa desde la finalización del tiempo de latencia hasta que se alcanza el 50% de biodegradación. Aunque estos ensayos no fueron diseñados para obtener constantes cinéticas, las curvas sigmoideas de degradación que se obtienen, pueden ser usadas para proporcionar tales constantes mediante un proceso de ajuste reiterativo de los datos experimentales (Quiroga, 1999).

Las cinéticas de biodegradación de compuestos orgánicos en el medio ambiente se han descrito usando una gran variedad de expresiones matemáticas, aumentando en

complejidad con el objeto de incluir las numerosas variables que pueden afectar a la velocidad del proceso de biodegradación

Un resumen de las expresiones cinéticas más usuales para describir los procesos de biodegradación se incluyen en los apartados 2.4.3.2. a 2.4.3.6. Unos aplicados al crecimiento de los microorganismos responsables del proceso y otros analizando la disminución de la concentración del compuesto a ensayar.

2.4.3.2. Modelo cinético de primer orden

Una aproximación simple, utilizada por la mayoría de los autores, es la de ajustar la curva de degradación a una ecuación de primer orden de la forma:

$$S = S_0 \cdot e^{-K_1 t}$$

Ecuación II. 1

donde:

S = concentración de sustrato que permanece sin degradar.

S_0 = concentración inicial de sustrato.

K_1 = constante de velocidad, t^{-1} .

t = tiempo.

La constante de velocidad K_1 de primer orden puede determinarse directamente mediante cálculo numérico utilizando métodos de regresión lineal, aunque también puede determinarse mediante un análisis de regresión no lineal de los datos (Larson, 1980).

Algunos autores consideran incompleta la Ecuación II. 1, pues en ella no se considera la existencia de un período inicial de adaptación. Si se considera este período inicial de adaptación, la expresión anterior queda de la forma:

$$\frac{dS}{dt} = -K_1 \cdot S$$

Ecuación II. 2

La velocidad de biodegradación es proporcional a la concentración de sustrato entonces:

$$\frac{dS}{S} = -K_1 \cdot dt$$

Ecuación II. 3

integrando:

$$\int_{S_0}^S \frac{dS}{S} = -K_1 \cdot \int_{t_0}^t dt \quad \Longrightarrow \quad S = S_0 \cdot e^{-K_1 \cdot (t-t_0)}$$

Ecuación II. 4

Si en lugar de la desaparición de sustrato, consideramos la aparición de un producto (por ejemplo la formación de CO₂), la cinética de primer orden se puede aplicar para la determinación de la velocidad de formación de dicho producto (Larson, 1980), por tanto la Ecuación II. 4 se transforma en:

$$S = a \cdot (1 - e^{-K_1 \cdot (1-c)})$$

Ecuación II. 5

donde a es la máxima cantidad de producto formado y c el período de adaptación.

La evolución de la producción de CO₂ durante la degradación de una gran variedad de sustancias químicas en el laboratorio puede ser descrita por una expresión de primer orden. La constante de velocidad observada, K₁, es un valor global para un conjunto de pasos metabólicos.

La constante de velocidad de primer orden K₁ se puede utilizar para calcular el tiempo de vida media de acuerdo con la expresión:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{K_1}$$

Ecuación II. 6

La cinética de primer orden se usa frecuentemente para describir la biodegradación de compuestos orgánicos en sistemas acuáticos, algunos valores de la constante de velocidad K_1 para compuestos tensioactivos aparecen reflejados en la Tabla II. 10. Las diferencias que aparecen entre los valores de K_1 se deben probablemente a variaciones en la calidad y/o cantidad de biomasa del entorno acuático.

Tabla II. 10.- Algunos de los valores de K_1 publicados para tensioactivos en aguas naturales

TENSIOACTIVO	K_1, d^{-1}	MUESTRA	REFERENCIA
C_{12} (LAS)	0.05	Río	Larson, 1981
C_{12} (LAS)	0.50	Río	Larson, 1981

Muchos autores consideran mas adecuado describir las reacciones anteriormente mencionadas utilizando cinéticas de pseudo-primer orden, debido a la participación de bacterias en las reacciones.

2.4.3.3. Cinéticas de Monod, co-metabolismo y segundo orden

El modelo de Monod no es aplicable a todas las situaciones bajo las que puede darse un proceso biodegradativo, entre otras razones porque fue un modelo concebido para cultivos puros consumiendo un único sustrato, pero existen otras muchas situaciones en las que el modelo puede proporcionar una buena aproximación del crecimiento de cultivos mixtos (Simkins, 1984).

En estos casos, el modelo da una buena, aunque indirecta, descripción de la desaparición del sustrato limitante del crecimiento. Además, algunas simplificaciones del

modelo (como la aproximación a una cinética de primer orden), pueden resultar una buena aproximación de los patrones de biodegradación observados bajo ciertas condiciones específicas.

Si consideramos que la velocidad de crecimiento viene dada por:

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X$$

Ecuación II. 7

donde X es la concentración de microorganismos y μ es la velocidad de crecimiento específica de la bacteria que degrada al sustrato, expresada como (tiempo)⁻¹, y si expresamos como Y el rendimiento de producción de biomasa, esto es, la proporción de sustrato original convertido en biomasa, el cual se asume constante a lo largo del proceso de biodegradación, la desaparición de sustrato puede ser definida por:

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y} \cdot \frac{dX}{dt}$$

Ecuación II. 8

donde S es la concentración de sustrato limitante del crecimiento celular. Estas velocidades pueden ser calculadas haciendo uso de la ecuación de Monod (Monod, 1949) en la que se asume que el crecimiento es un proceso continuo y que la masa celular se produce durante la utilización del sustrato:

$$\mu = \frac{\mu_{\max} \cdot S}{K_s + S}$$

Ecuación II. 9

La relación entre la velocidad de crecimiento bacteriano y la concentración de sustrato se muestra en la Figura II. 12. Se puede observar que la velocidad de crecimiento

es una función hiperbólica de la concentración de sustrato y que tiende a μ_{\max} a altas concentraciones.

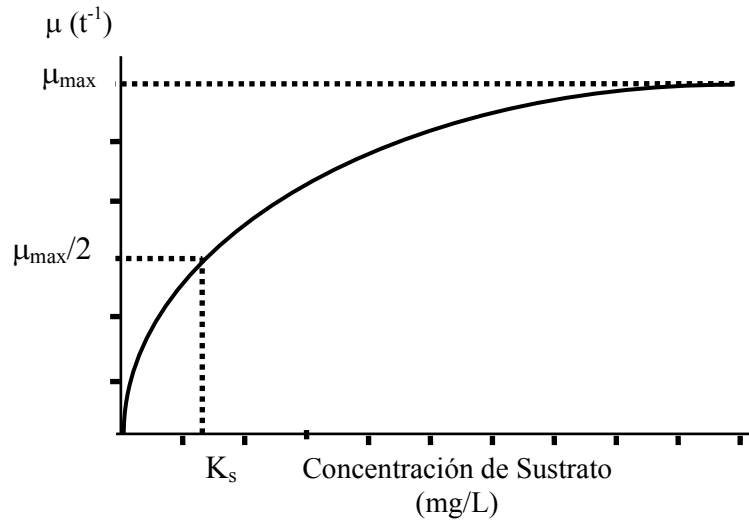


Figura II. 12.- Evolución de la velocidad específica de crecimiento en función de la concentración de sustrato

Sustituyendo la Ecuación II. 9 en la Ecuación II. 7, obtenemos:

$$\frac{dX}{dt} = \frac{\mu_{\max} \cdot S \cdot X}{K_s + S}$$

Ecuación II. 10

donde μ_{\max} es la velocidad máxima de crecimiento específico de los microorganismos y K_s es la constante de saturación de sustrato, esto es, la concentración de sustrato a la que se da una velocidad específica de crecimiento igual a la mitad de la máxima (Figura II. 12). Por lo tanto, sustituyendo la Ecuación II. 10 en la Ecuación II. 8 obtenemos:

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{\mu_{\max} \cdot S \cdot X}{Y \cdot (K_s + S)}$$

Ecuación II. 11

Esta es la forma generalmente aceptada del modelo de Monod para el consumo de sustrato como única fuente de carbono y energía, aunque como ya se ha comentado anteriormente, existen algunas limitaciones a la hora de aplicarla a datos de biodegradación en medios acuáticos naturales, por ejemplo, en muchos entornos ambientales el crecimiento bacteriano puede ser debido a otros sustratos que pueden actuar o no como limitantes (Battersby, 1990).

Schmidt y col. (Schmidt, 1985) han publicado ecuaciones cinéticas más complejas, doce en total, para considerar factores tales como la inhibición o la utilización de un segundo sustrato.

La utilización del modelo de Monod asume que el coeficiente de rendimiento Y presenta un valor constante (alrededor de 0.5), sin embargo, existen datos que indican que a bajas concentraciones una gran cantidad de la energía resultante del proceso de biodegradación se utiliza para mantener los requerimientos energéticos y no solo para el crecimiento.

Por otra parte, estudios de laboratorio han demostrado que muchos compuestos sintéticos son transformados por bacterias que no utilizan estos sustratos como única fuente de carbono y energía, aparecen por tanto sustratos que soportan el crecimiento de microorganismos y sustratos que no lo soportan. Este fenómeno ha sido calificado como co-metabolismo y fue definido por Dalton (Dalton, 1982). El co-metabolismo se debe probablemente a la carencia de especificidad de ciertas enzimas microbianas, y tiene importantes consecuencias en términos de persistencia de un compuesto orgánico en el medio ambiente. Un compuesto co-metabolizado es transformado a una velocidad muy pequeña, y los productos resultantes son estructuralmente semejantes al compuesto de partida.

Algunos autores proponen la aplicación de la Ecuación II. 11 para procesos de co-metabolismo tomando la precaución de definir los parámetros cinéticos Y y μ_{\max} próximos a 0.

En la mayoría de los entornos ambientales del medio acuático las concentraciones de los compuestos químicos sintéticos son bajas y muy inferiores a K_S (cuyo valor suele ser del orden 0.1-10 mg/L). Bajo estas condiciones la Ecuación II. 11 se puede aproximar a la Ecuación II. 12:

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{\mu_{\max}}{Y \cdot K_s} \cdot S \cdot B = K_2 \cdot S \cdot B$$

Ecuación II. 12

donde K_2 es la constante de velocidad de segundo orden, estas constantes son determinadas frecuentemente en ensayos del tipo “die-away”.

2.4.3.4. Elección del modelo cinético mas adecuado para un conjunto de datos de biodegradación

Ecuación de Monod integrada

Simkins y Alexander (Simkins, 1984) expresaron la ecuación de Monod como:

$$\frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} = \mu = \frac{\mu_{\max} \cdot S}{K_s + S}$$

Ecuación II. 13

y propusieron que la diversidad de las curvas de consumo de sustrato obtenidas en los diferentes ensayos de biodegradación realizados, es el resultado de la interacción entre S y X. Estos autores expresaron el balance de materia en un reactor en discontinuo como:

$$S_0 + q \cdot X_0 = S + q \cdot X$$

Ecuación II. 14

donde:

S_0 = concentración inicial de sustrato.

X_0 = concentración inicial de microorganismos.

q = inverso del coeficiente de rendimiento, (1/Y).

El valor de q se puede considerar razonablemente constante cuando la fuente de carbono es el sustrato limitante del crecimiento, pero cambia notablemente con las concentraciones de nitrógeno y fósforo del medio. No obstante, dado que las

concentraciones de nutrientes inorgánicos eran similares en los ensayos realizados, asumieron q constante. El conocimiento del valor de q no resulta necesario cuando el aspecto de interés es la desaparición de sustrato y no el crecimiento bacteriano; en este caso, el término $q \cdot X$ puede ser reemplazado por B , parámetro que se corresponde con la cantidad de sustrato requerido para producir una densidad celular X . De forma similar B_0 es definido como $q \cdot X_0$, de modo que la Ecuación II. 14 se transforma en:

$$S_0 + B_0 = S + B$$

Ecuación II. 15

de este modo, la Ecuación II. 13 puede ser escrita como:

$$\frac{1}{B} \cdot \frac{dB}{dt} = \frac{\mu_{\max} \cdot S}{K_S + S}$$

Ecuación II. 16

despejando B de la Ecuación II. 15, derivando con respecto al tiempo y sustituyendo el término dB/dt en la Ecuación II. 16 se obtiene que:

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{\mu_{\max} \cdot S \cdot (S_0 + B_0 - S)}{K_S + S}$$

Ecuación II. 17

Los autores llamaron a la Ecuación II. 17, la ecuación integrada de Monod, la cual da lugar a seis formas simplificadas, que representan situaciones en las que se dan relaciones extremas, entre la densidad de inóculo y la concentración de sustrato inicial o entre la concentración de sustrato y K_S . Estas formas se recogen en la Tabla II. 11, la cual contiene también las condiciones que llevan a ellas y las constantes de velocidad que se derivarían de su aplicación.

Tabla II. 11.- Modelos cinéticos de biodegradación usando solamente las variables, concentración de sustrato y de biomasa (Simkins, 1984)

Modelo	Condiciones Necesarias	Ecuación $-dS/dt =$	Constantes (unidades)
A) Primer Orden	$B_0 \gg S_0$ $S_0 \ll K_S$	$K_1 \cdot S$	$K_1 = \frac{\mu_{max} \cdot B_0}{K_S}$ (h^{-1})
B) Logístico	$S_0 \ll K_S$	$K_3 \cdot S \cdot (S_0 + B_0 - S)$	$K_3 = \frac{\mu_{max}}{K_S}$ ($mg \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$)
C) Monod (sin crecimiento)	$B_0 \gg S_0$	$\frac{K_0 \cdot S}{(K_S + S)}$	$K_0 = \mu_{max} \cdot B_0$ ($mg \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$)
D) Monod (con crecimiento)	Ninguna	$\frac{\mu_{max} \cdot S \cdot (S_0 + B_0 - S)}{(K_S + S)}$	μ_{max} (h^{-1})
E) Orden Cero	$B_0 \gg S_0$ $S_0 \gg K_S$	K_0	$K_0 = \mu_{max} \cdot B_0$ ($mg \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$)
F) Logarítmico	$S_0 \gg K_S$	$\mu_{max} \cdot (S_0 + B_0 - S)$	μ_{max} (h^{-1})

Las condiciones bajo las que las seis ecuaciones resultan útiles aparecen de forma más clara en la Figura II. 13 (Simkins, 1984). A modo de ejemplo, K_S se ha tomado como 1 mg/L y se representa por la línea vertical continua, y q se ha tomado como 1 pg de sustrato por célula. Los puntos a lo largo de la línea diagonal, representan las densidades microbianas que darían lugar a una división de las células activas, para diferentes concentraciones iniciales de sustrato. Los sistemas con concentraciones iniciales de microorganismos situadas por encima de esta línea, para una concentración inicial de sustrato dada, mantendrían la concentración celular aproximadamente constante a lo largo de la biodegradación, dado que habría una cantidad de sustrato insuficiente para producir un aumento celular significativo. La línea vertical discontinua está situada a una concentración de sustrato de aproximadamente 1.5 órdenes de magnitud superior a K_S , y separa las condiciones bajo las que la capacidad de consumo de los organismos activos está prácticamente saturada hasta casi el agotamiento del sustrato (a la derecha de la línea), de aquellas condiciones bajo las que la velocidad de biodegradación por unidad celular varía apreciablemente con la concentración de sustrato.

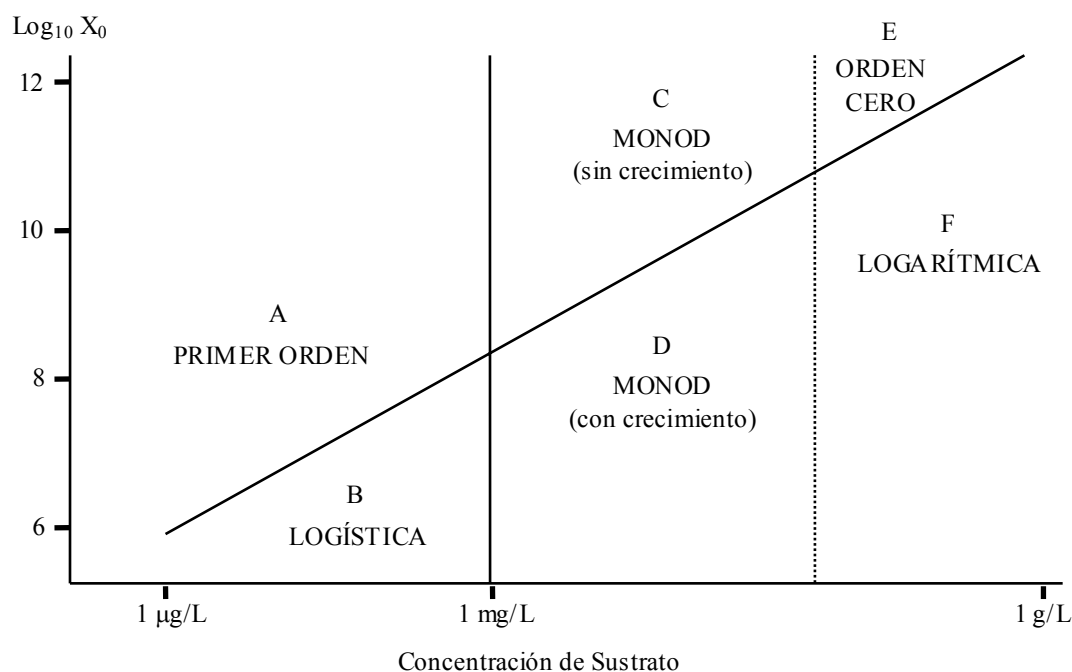


Figura II. 13.- Modelos cinéticos en función de la concentración de sustrato y biomasa (Simkins, 1984)

A partir de las dos líneas verticales y la línea diagonal, pueden ser predichos los intervalos aproximados de concentración inicial de sustrato y de microorganismos que mostrarían una cinética de mineralización correspondiente a las seis simplificaciones del modelo. En el caso de que se tratase de otros sustratos, así como de poblaciones diferentes (provenientes de otra fuente), los diagramas serían similares, pero las líneas verticales y los puntos de corte con la diagonal estarían en posiciones diferentes. También, la posición de las líneas es un tanto arbitraria, y puede variar con la precisión de los métodos de ensayo y análisis empleados.

A concentraciones de sustrato por debajo de K_s , la cual es la situación usual en el caso de ensayos de simulación de compartimentos ambientales naturales, la degradación puede ser descrita bien por cinéticas de primer orden o bien por una cinética logística. En la zona A Figura II. 13 no tiene lugar un aumento significativo de la densidad celular a lo largo del proceso biodegradativo, de modo que se aplica una cinética de primer orden. En la zona B, la pequeña población crece a expensas del compuesto de ensayo (a niveles traza) a muy bajas velocidades, incluso descendentes, típico de cinéticas logísticas. La diferencia entre estos dos tipos de modelos es tan sutil, que a menudo ocurre que la precisión de los

datos experimentales de biodegradación, puede no ser lo suficientemente buena para distinguir entre los dos tipos (Alexander, 1985). La zona D representa la adición de un pequeño número de células a un sistema que contiene sustrato a una concentración por encima de K_s , y la cinética es descrita por el modelo de Monod: el crecimiento ocurre a medida que el sustrato desaparece.

Por otra parte, cuando la concentración de sustrato es mucho mayor que K_s , la gran cantidad de sustrato adicionado será degradado por un sistema biológico cuya capacidad de consumo se encuentra saturada. Estas condiciones, zona F, permiten aproximar el término (K_s+S) a S , y la cinética sigue el modelo logarítmico, hasta que el sustrato está casi agotado. Cuando la concentración inicial de sustrato es insuficiente para soportar un aumento significativo en la población, estando la capacidad de consumo saturada, zona E, la eliminación de sustrato será lineal, y se aplicará una cinética de orden cero.

Por último, la ecuación cinética de Monod sin crecimiento puede ser utilizada en situaciones en las que, a pesar de adicionar una cantidad de sustrato por encima del valor de K_s , la elevada densidad celular del medio hace que el aumento de la población que supone el consumo de dicho sustrato no resulte significativo en comparación con la inicialmente existente (Zona C). Esta ecuación sin crecimiento es análoga a la ecuación de Michaelis-Menten de cinética enzimática.

Las curvas de biodegradación representando a los distintos modelos cinéticos se muestran en la Figura II. 14 (Alexander, 1985).

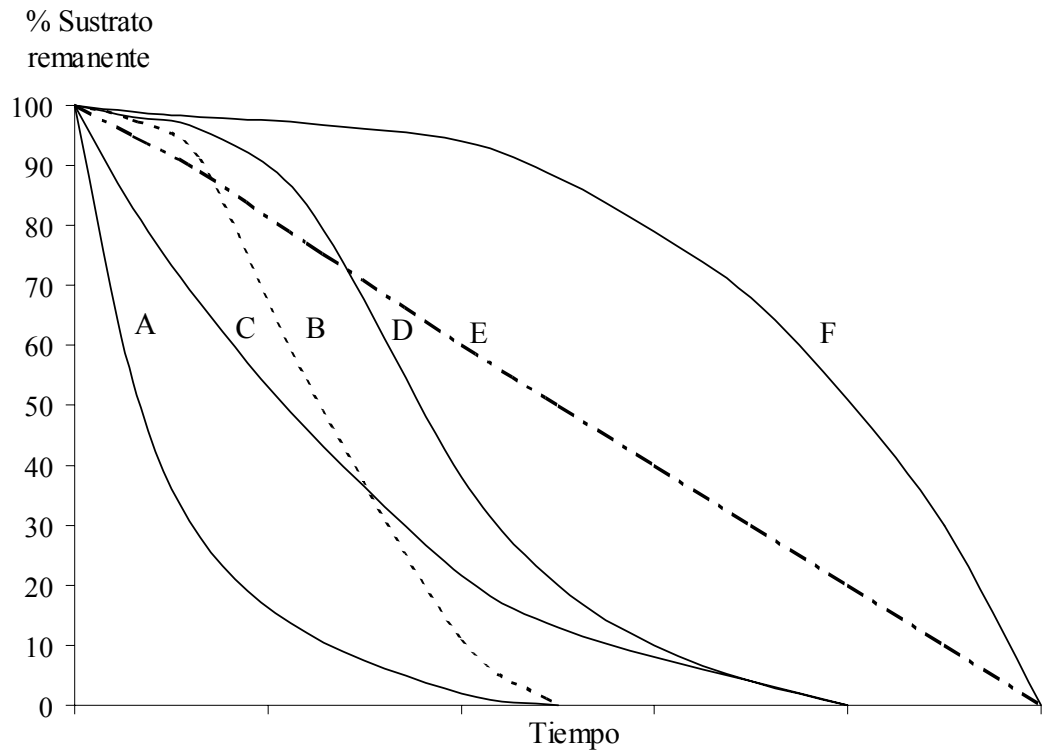


Figura II. 14.- Curvas de biodegradación de compuestos de acuerdo con los modelos cinéticos mostrados en Tabla II. 11

2.4.3.5. Modelo cinético de Quiroga-Sales

Quiroga y Sales (Quiroga, 1998) desarrollan un modelo cinético en el que la velocidad de degradación viene dada por un polinomio de segundo grado, exclusivamente en función de la concentración de sustrato. La ecuación representativa del modelo es:

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

Ecuación II. 18

separando variables e integrando, se puede obtener la relación existente entre la materia orgánica y el tiempo de degradación:

$$\int_0^t dt = \int_{S_0}^S \frac{dS}{(K_2 \cdot S^2 + K_1 \cdot S + K_0)}$$

Ecuación II. 19

la concentración de tensioactivo puede evaluarse por la expresión:

$$S = \frac{h \cdot (S_0 - q) - q \cdot (S_0 - h) \cdot e^{p \cdot t}}{(S_0 - q) - (S_0 - h) \cdot e^{p \cdot t}}$$

Ecuación II. 20

siendo:

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

Ecuación II. 21

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

Ecuación II. 22

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

Ecuación II. 23

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.

S_0 = concentración inicial de sustrato.

S = concentración de sustrato.

La representación de la concentración de sustrato frente al tiempo dada por la Ecuación II. 20, conduce a una curva cuya forma puede visualizarse en la Figura II. 15.

De la Ecuación II. 20 se sigue que la velocidad de consumo de sustrato se anula cuando la concentración de sustrato presente en el medio es igual a "q" o "h", ya que estas

serían las soluciones de dicha ecuación. El hecho de que la velocidad de consumo de sustrato se anule para el valor de la concentración de materia orgánica $S = q$, implica que q es el valor mínimo alcanzable de concentración de materia orgánica y, por tanto, representa el nivel de materia orgánica no biodegradable para este tipo de microorganismos.

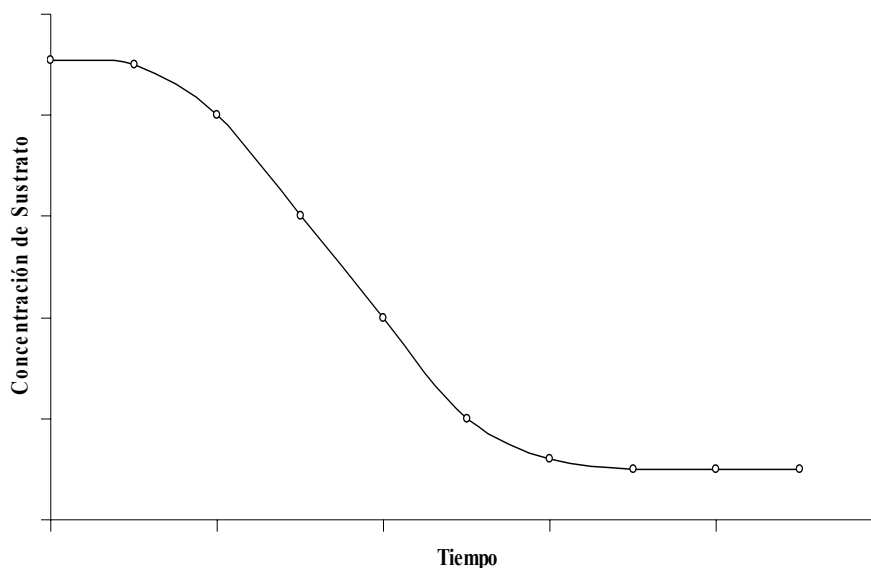


Figura II. 15.- Representación gráfica de la Ecuación II. 20

Dicho modelo ha sido aplicado con éxito tanto a la degradación de tensioactivos en aguas naturales (Quiroga, 1999, Perales, 1999), en presencia como en ausencia de sedimentos, como a otros sustratos orgánicos (vinazas, etc.) (Romero, 1991).

Las bases teóricas del modelo hay que buscarlas en el modelo no estructurado de crecimiento de microorganismos en reactores discontinuos propuesto por Velhurst, Pearl y Read (Bayley, 1980), así como en la suposición de Gaden (Gaden, 1959).

Dicho modelo prevé, una fase de adaptación al nuevo sustrato por parte de la microbiota presente en el medio, seguida de un crecimiento exponencial del número de microorganismos, fase en la que se produce de forma efectiva la biodegradación, y una fase final en la que la concentración residual del sustrato debe tender asintóticamente a cero y que coincide con un estacionamiento del crecimiento de los microorganismos.

Atendiendo a la forma de la curva de concentración frente al tiempo obtenida experimentalmente, dicho modelo proporciona diferentes situaciones que es posible

encontrar en un proceso de biodegradación, mediante la anulación de algunos de los términos del polinomio (Quiroga, 1991).

Lógicamente, en la aplicación del modelo se han adoptado importantes simplificaciones del proceso real, ya que de lo contrario la aplicación del modelo a los resultados experimentales sería prácticamente inviable. Las simplificaciones que se introducen son las siguientes:

Respecto de la heterogeneidad del sistema, ha de considerarse que las diferentes etapas de transferencia de materia y de reacción química (considerada como un todo) están conectadas en serie. Así, los sustratos han de difundirse desde la fase líquida hasta el interior de los microorganismos, atravesando la capa límite que rodea al microorganismo, la membrana celular y transportándose hacia el interior para, una vez alcanzado el centro reactivo, reaccionar. Por todo ello, las etapas están conectadas en serie y la velocidad global vendrá limitada por la etapa más lenta. Normalmente se considera que la etapa de reacción es la limitante de la velocidad.

Respecto del conjunto de reacciones consecutivas que dan lugar a la degradación del sustrato ha de considerarse que están conectadas en serie, por lo que la velocidad de consumo de sustrato corresponderá a la de la etapa más lenta del proceso. Esta etapa puede considerarse elemental y es la que determina la velocidad de reacción.

La segunda hipótesis que se efectúa es que aunque son posibles diferentes rutas metabólicas alternativas, las cantidades desviadas con respecto de la que se considera reacción principal, permanecen constantes. Por ello, es posible simplificar el esquema de rutas metabólicas conectadas en serie-paralelo a una única ruta.

2.4.3.6. Modelo cinético de Romero

Teniendo en cuenta las simplificaciones anteriores, Romero (Romero, 1991), asemeja el comportamiento de un proceso de degradación en discontinuo al de un reactor autocatalítico, ya que cuando se añade a éste una sustancia orgánica, se observa al principio del experimento una conversión lenta del sustrato. Como el microorganismo se multiplica conforme avanza la reacción, la velocidad de reacción aumenta hasta alcanzar un máximo y cuando se produce un descenso gradual de la fuente de carbono (en sistemas en discontinuo), se produce un descenso de la velocidad de la reacción hasta que ésta se

anula. Este comportamiento es claramente autocatalítico y presenta la siguiente ecuación de velocidad:

$$S + n \rightarrow \alpha \cdot P + \sigma \cdot n \Rightarrow -V_S = -\frac{dS}{dt} = K_v \cdot S \cdot n$$

Ecuación II. 24

Considerando la estequiometría de la reacción, por cada molécula de S que desaparece se forman α moléculas de P y se originan un número de microorganismos σ (σ debe ser > 1), por lo que si partimos de una concentración inicial S_0 y de un número inicial de microorganismos n_0 , cuando haya desaparecido una cierta cantidad de sustrato y la cantidad de sustrato que queda en el medio sea S, se habrán originado un número de microorganismos n , dado por la expresión $\sigma (S_0 - S)$, de forma que el número de microorganismos que existe en el medio en un instante determinado (y que es el que nosotros medimos realmente) es: $n = \sigma (S_0 - S) + n_0$ y sustituyendo en la expresión de la velocidad tendremos:

$$-\frac{dS}{dt} = K_v \cdot S \cdot [n_0 + \sigma \cdot (S_0 - S)]$$

Ecuación II. 25

$$-\frac{dS}{dt} = K_v \cdot S \cdot \sigma \cdot \left[\frac{n_0}{\sigma} + S_0 - S \right]$$

Ecuación II. 26

$$-\frac{dS}{dt} = K_v \cdot \sigma \cdot \left[\left(\frac{n_0}{\sigma} + S_0 \right) \cdot S - S^2 \right]$$

Ecuación II. 27

Como puede verse, dicha ecuación corresponde a un polinomio de segundo grado respecto a la concentración de sustrato presente en el medio, como se propone en la ecuación empírica de Quiroga y Sales (Quiroga, 1991).

La integración de esta ecuación de velocidad permite obtener las expresiones que relacionan las concentraciones de las diferentes variables de estado (Sustrato (S) y biomasa (X_V)) con el tiempo de incubación.

$$S_t = \frac{S_0 \cdot (S_{t_0} - S_{nb}) + S_{nb} \cdot (S_{t_0} - S_0) \cdot e^{\mu_{\max} \cdot t}}{(S_{t_0} - S_{nb}) + (S_{t_0} - S_0) \cdot e^{\mu_{\max} \cdot t}}$$

Ecuación II. 28

$$X_V = \frac{X_{V_0} \cdot e^{\mu_{\max} \cdot t}}{1 - \frac{X_{V_0}}{X_{V_{\max}}} \cdot (1 - e^{\mu_{\max} \cdot t})} = Y_{X/S} \cdot \frac{(S_0 - S_{nb}) \cdot (S_0 - S_{t_0}) \cdot e^{\mu_{\max} \cdot t}}{(S_{t_0} - S_{nb}) + (S_0 - S_{t_0}) \cdot e^{\mu_{\max} \cdot t}}$$

Ecuación II. 29

donde:

S_t = concentración total de sustrato en un instante t.

S_{t_0} = concentración inicial total de sustrato.

S_0 = máxima concentración de sustrato invertible en formación de biomasa.

S_{nb} = concentración de sustrato no biodegradable.

μ_{\max} = máxima velocidad específica de crecimiento de los microorganismos.

X_V = concentración de biomasa en un instante t.

X_{V_0} = concentración inicial de biomasa.

$X_{V_{\max}}$ = máxima concentración de biomasa alcanzada.

$Y_{X/S}$ = coeficiente de rendimiento biomasa/sustrato.

Romero, (Romero, 1991) da una interpretación física a los parámetros cinéticos p , h y q obtenidos por Quiroga y Sales (Quiroga, 1989) a partir de las expresiones matemáticas utilizadas.

Así “ p ” tendría la significación de una velocidad máxima ya que es el producto de la constante de velocidad observada por la concentración máxima de microorganismos

alcanzable en el medio. Es decir, supondría aquella velocidad máxima alcanzable cuando el término $K_2 = 0$. El término “ h ” tiene dimensiones de sustrato y corresponde a la máxima cantidad disponible en el medio para formar biomasa e incluye el término relativo a la concentración inicial de microorganismos. Finalmente, el término “ q ” representa la concentración de sustrato no metabolizable por los microorganismos que ya habría predicho el modelo de Quiroga-Sales. Lógicamente, la velocidad de degradación en procesos discontinuos se anula para los valores de “ h ” y “ q ” (cuando aún no han comenzado a degradar el sustrato y cuando no existe sustrato biodegradable en el medio, respectivamente).

El modelo de Romero contempla también las diferentes simplificaciones del modelo de Quiroga y Sales, pero a partir de posibles situaciones que puedan darse en el proceso. Así, por ejemplo, cuando no existe concentración de sustrato no biodegradable en el medio, la ecuación polinómica de segundo grado (Ecuación II. 18) se transforma en:

$$-\frac{dS}{dt} = K_2 \cdot S_T^2 + K_1 \cdot S_T$$

Ecuación II. 30

En los casos en los que la concentración de microorganismos activos se mantenga prácticamente constante, porque la concentración de éstos en el medio sea muchísimo mayor que la que se pueda formar durante el proceso de biodegradación del sustrato, la ecuación de velocidad inicial se transforma en simplificaciones del modelo cuando los coeficientes K_2 y K_0 son despreciables.

$$V = -\frac{dS}{dt} = K_1 \cdot S_T$$

Ecuación II. 31

Si no todo el sustrato es biodegradable, además de permanecer “ n ” constante, la ecuación toma la forma:

$$-\frac{dS}{dt} = K_1 \cdot S_T + K_0$$

Ecuación II. 32

2.4.4. RUTAS DE BIODEGRADACIÓN

Los mecanismos aceptados como principales responsables de la destrucción de una molécula orgánica, son tres: oxidación metflica, β -oxidación y oxidación aromática (Swisher, 1987).

El mecanismo de oxidación metflica es el que interviene en la degradación de las moléculas de hidrocarburos con alto peso molecular y que, como producto final, origina una molécula de ácido graso.

La β -oxidación es la vía normal según la cual se degradan o sintetizan los ácidos grasos, compuestos esenciales para los procesos vitales. En forma resumida, el proceso consiste en un acortamiento de la cadena hidrocarbonada en dos unidades, con liberación de un radical de acetato. Sucesivas etapas de β -oxidación provocan la total conversión de la molécula original en CO_2 , agua y biomasa. En un sistema aeróbico, el hidrógeno termina por desprenderse en forma de agua y, en un sistema anaerobio, en forma de metano o de ácido sulfhídrico.

En el mecanismo de oxidación aromática el resultado es la producción de un compuesto del tipo del ácido-cetoadípico, que se ve sometido posteriormente al mecanismo de β -oxidación hasta su total biodegradación, generando grupos acetato y succinato.

En el caso de las moléculas de tensioactivos, que poseen grupos un tanto especiales, paralelamente o posteriormente a los mecanismos antes mencionados, tienen lugar procesos de hidrólisis o desulfonación, con lo que se originan productos que sufren uno o varios de los mecanismos ya comentados.

2.4.4.1. Alcoholes grasos etoxilados

La influencia de parámetros tales como la longitud de la cadena etoxilada y la posición del enlace con la cadena hidrofóbica ha sido estudiada en numerosas ocasiones. Patterson propuso dos posibles mecanismos que ocurren simultáneamente durante la degradación de los alcoholes grasos etoxilados: una fisión de la molécula en dos entidades, una hidrófoba y otra hidrófila y una oxidación rápida del grupo hidrofóbico (Patterson, 1970).

Otros autores han propuesto tres mecanismos diferentes para la biodegradación aerobia de alcoholes grasos etoxilados (Figura II. 16): una escisión central de la molécula, un ataque microbiano al carbono terminal de la cadena alquílica a través de una ω,β -oxidación, y un ataque primario al carbono terminal de la cadena polietoxilada mediante un proceso hidrolítico similar al que muestran los tensioactivos no iónicos del tipo alquilfenol polietoxilado (Marcomini, 2000). Así pues, el mecanismo hidrolítico es el responsable de la degradación de la cadena etoxilada (Osburn, 1966).

El mecanismo de escisión central conduce a la formación de polietilenglicol con la misma longitud que la cadena etoxilada, alcoholes grasos y posteriormente ácidos grasos resultantes del resto alquílico. La biodegradación de los alcoholes grasos se considera rápida y completa (Swisher, 1987), ya que las moléculas de alcohol graso no son detectadas en experimentos de biodegradación de AGE. Las moléculas de polietilenglicol se degradan posteriormente mediante un mecanismo hidrolítico y/o hidrolítico oxidativo con la consiguiente formación de polietilenglicol mono o di-carboxilado.

El mecanismo de ataque al carbono terminal de la cadena alquílica determina una ω -oxidación seguida de una serie de β -oxidaciones que conducen a la formación de polietilenglicol monocarboxilados.

El mecanismo de ataque primario al carbono terminal de la cadena polietoxilada tiene lugar mediante una serie de acortamientos de la cadena polietoxilada formándose finalmente polietilenglicol dicarboxilado.

La determinación de polietilenglicol en diferentes muestras ambientales se ha visto facilitada en los últimos años por el desarrollo de métodos de análisis como técnicas tensiométricas indirectas (ITM).

La división y oxidación de la cadena alquílica son mecanismos que han sido propuestos para la biodegradación de alcoholes etoxilados lineales, mientras que la biodegradación primaria a través de un ataque a la cadena polietoxilada ha sido propuesto para alcoholes etoxilados ramificados (Marcomini, 2000).

En los ensayos de biodegradación que simulan una planta de tratamiento de aguas residuales el mecanismo de división central (que es el mecanismo dominante) se produce independientemente de las diferencias existentes en la cadena alquílica del AGE, de la longitud de la cadena etoxilada, del tipo de fango, tipo de planta y del tiempo de retención hidráulico (Szymanski, 2000).

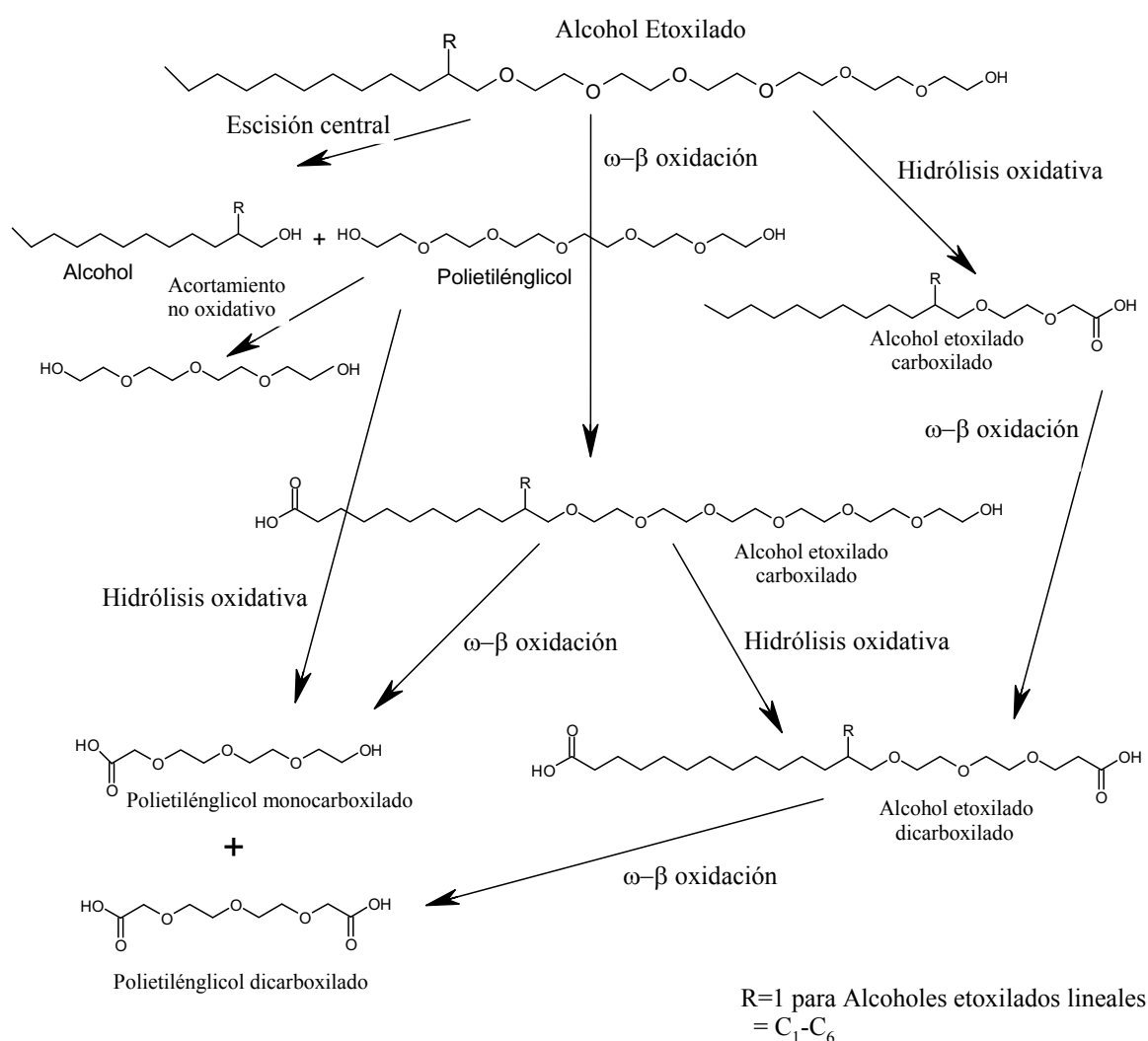


Figura II. 16.- Mecanismo de biodegradación y metabolitos para la degradación aerobia de alcoholes grasos etoxilados

2.4.4.2. Nonilfenoles polietoxilados

La ruta de biodegradación de los alquilfenoles polietoxilados (APEO) ha sido seguida en numerosos estudios realizados tanto en experimentos de laboratorio como en plantas de tratamiento, siendo la más aceptada la propuesta por Yoshimura (Yoshimura, 1986). Todos los mecanismos de biodegradación que aparecen en esa ruta, con sus respectivos metabolitos, son posibles, y su importancia relativa depende de las condiciones ambientales bajo las que transcurre el proceso de biodegradación. Además la transformación que sufren los metabolitos en condiciones anaerobias da lugar a alquilfenol.

En el caso de los alquilfenoles polietoxilados, a diferencia de lo que ocurre con los alcoholes etoxilados, algunos autores proponen que no existe evidencia de hidrólisis en el enlace eter-fenólico para liberar polietilenglicol por un lado y alquilfenol por otro, debido probablemente a factores estéricos. Si existe evidencia de que la cadena etoxilada se acorta un mol de etilenglicol en cada paso (Schröder, 1993), permaneciendo unida al resto hidrófobo. Este acortamiento parece ser meramente hidrolítico, liberando etilenglicol que será posteriormente oxidado.

Otros autores afirman que en las condiciones de un ensayo de simulación mediante fangos activados los APEO siguen un mecanismo de ω -oxidación de la cadena etoxilada y otro de división central. Como resultado de estas rutas se forma alquilfenol, alquilfenoles mono y di-etoxilados (compuestos persistentes) y polietilenglicol mono y di-carboxilado respectivamente (Franska, 2003).

La oxidación de la cadena hidrofóbica ya había sido puesta de manifiesto en los trabajos desarrollados por Osburn (Osburn, 1966), en los que se encuentran evidencias de que la cadena hidrocarbonada puede oxidarse apareciendo carboxilada, pese a estos resultados este no parece ser un mecanismo principal de degradación de APEO.

Para el nonilfenol polietoxilado (NPEO) se han propuesto dos posibles rutas de biodegradación (Figura II. 17). En la ruta hidrolítica oxidativa (A) los principales metabolitos son los ácidos alquilfenoxi acéticos seguidos de los metabolitos doblemente oxidados (Jonkers, 2004). De la ruta hidrolítica no oxidativa (B) resultan cadenas cortas de NPEO: NP₁EO (Nonilfenol monoetoxilado), NP₂EO (Nonilfenol dietoxilado) y NP (Nonilfenol). Esta es la ruta principal que aparece en agua de mar y sedimentos.

Los NPEO y sus oligómeros ácidos carboxílicos son relativamente hidrofílicos, tienen una escasa tendencia a adsorberse en las partículas durante los procesos de tratamiento, y por lo tanto pueden permanecer predominantemente en solución antes de ser degradados. NP y los nonilfenoles mono o di-etoxilados son más hidrofóbicos (Ahel, 1987) por tanto tienen una enorme tendencia a la adsorción encontrándose en grandes cantidades en los lodos de EDARs.

Las rutas metabólicas conducen a la formación de biointermediatos que resultan ser persistentes (Ahel, 2000) y más tóxicos que el compuesto de partida (Fujita, 2000).

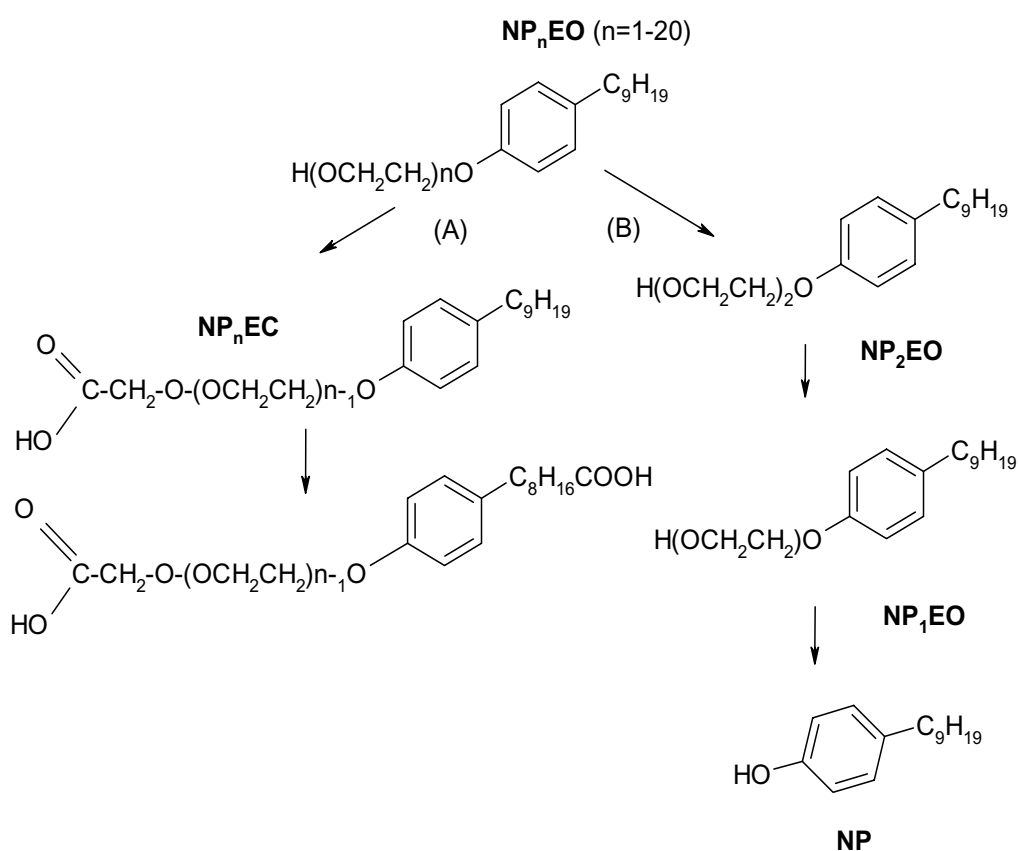


Figura II. 17.- Rutas de biodegradación del nonilfenol polietoxilado: (A) ruta hidrolítica oxidativa y (B) ruta hidrolítica no oxidativa

2.4.4.3. Alquilpoliglucósidos

Para la determinación analítica de los APG se describen diversos métodos en la literatura tales como determinaciones colorimétricas o cromatografía de capa fina, sin embargo dada la baja sensibilidad de estos métodos, para la detección de APG a bajas concentraciones, tal como ocurre en muestras ambientales, se requieren métodos más sofisticados como cromatografía gaseosa o líquida y espectrometría de masas. Eichhorn (Eichhorn, 1999) aplicó estos métodos de análisis en ensayos de biodegradabilidad para la detección de los metabolitos de biodegradación.

El mecanismo de biodegradación propuesto es el que aparece en la Figura II. 18. En la ruta I el primer paso es una ω -oxidación de la cadena alquílica seguida de una β -oxidación. En la ruta II se produce una ruptura del enlace glucosídico conduciendo a la aparición de glucosa y alcohol graso, la glucosa es metabolizada rápidamente vía piruvato, mientras que el alcohol graso es oxidado al correspondiente ácido, que se verá sometido al mecanismo clásico de degradación de los ácidos grasos.

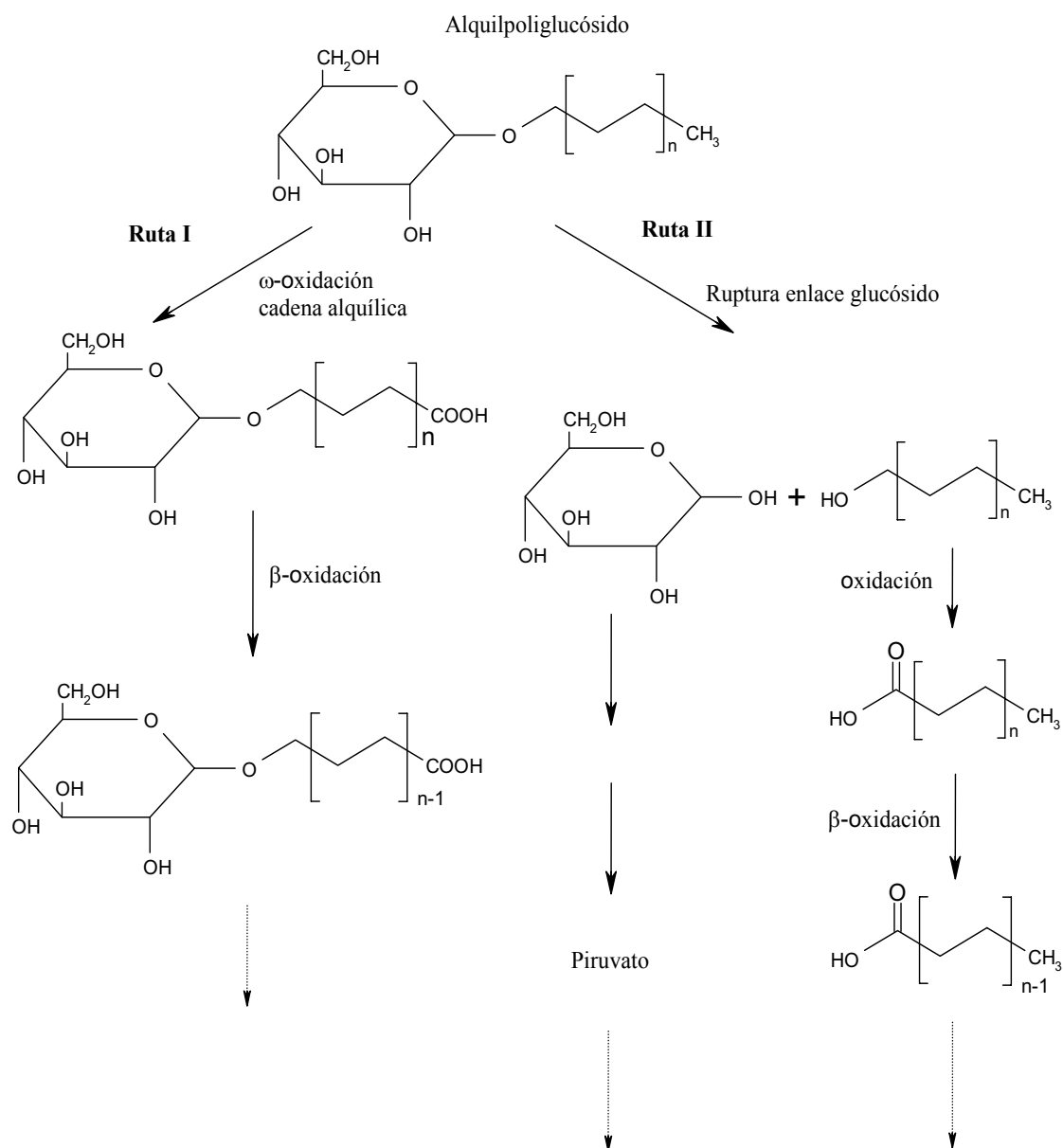


Figura II. 18.- Rutas de biodegradación de los alquilpoliglucósidos

2.4.4.4. Lineal alquilbenceno sulfonatos

Es un hecho demostrado que la ruta de biodegradación del LAS conlleva una serie de etapas en las que la pérdida de actividad superficial en la secuencia bioquímica se corresponde con la pérdida de respuesta al método del azul de metileno para la determinación de tensioactivos aniónicos (Swisher, 1963).

La labor de Swisher junto con las aportaciones de otros autores (Hammerton, 1956; Huddleston, 1963; Divo, 1980) han dado como resultado la posible ruta metabólica a

través de la cual los microorganismos aerobios degradan y mineralizan los LAS. Esta ruta aparece recogida en la Figura II. 19.

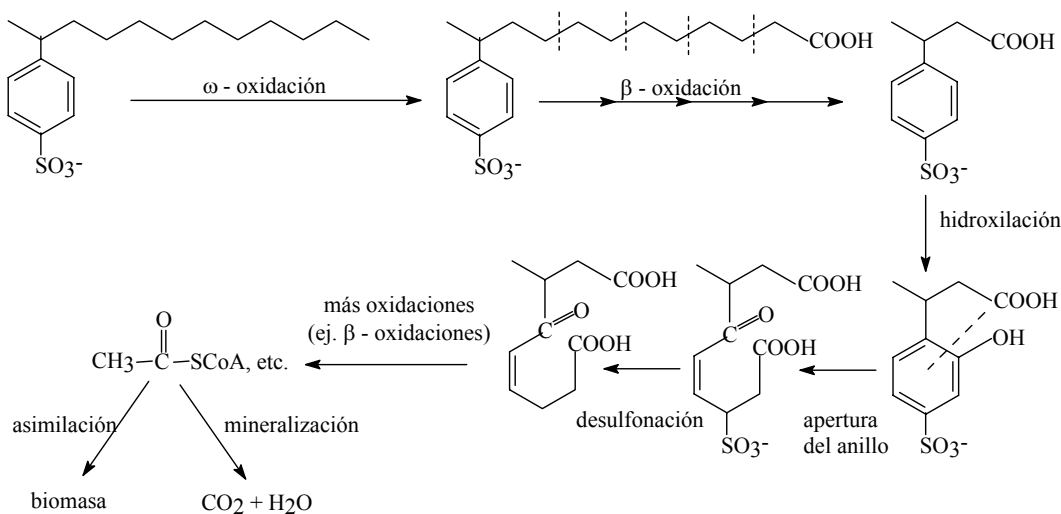


Figura II. 19.- Esquema de la ruta de biodegradación aerobia del LAS

En términos generales, se puede decir que el proceso es similar en el medio natural y en las plantas de tratamiento de aguas residuales, siendo posible distinguir los cuatro pasos fundamentales siguientes:

- Conversión oxidativa de uno de los dos grupos metilos de la cadena alquílica en grupo carboxílico (ω -oxidación). (Hammerston, 1956; Huddleston, 1963)
- Acortamiento oxidativo de la cadena alquílica en dos unidades de átomos de carbono (β -oxidación).
- Escisión oxidativa del anillo.
- Ruptura del enlace carbono-azufre (C-S) con liberación del grupo sulfonato.

La ω y β -oxidación son las formas oxidativas predominantes en la biodegradación de la cadena, se identificaron diversos intermediatos como consecuencia de una combinación de estas oxidaciones, aunque no es la única ruta. Posteriormente se detectaron otras cinco vías de reacción diferentes a la propuesta anterior, las cuales se esquematizan a continuación:

- ω -oxidación con subsiguiente β -oxidación de la cadena alifática, pero no desulfonación ni degradación posterior.

- ω -oxidación con subsiguiente β -oxidación y simultánea desulfonación y escisión del anillo.
- Análoga al caso anterior pero acompañada por la reducción que supone la desulfonación. Así, en este caso, el fenilacetato es producido a partir del p-hidroxipentilalcanoato.
- α -oxidación seguida de β -oxidación y posterior desulfonación del anillo sin ataque a éste.
- Si la cadena alquílica tiene un bajo número de átomos de carbono (<4), la degradación comienza por el anillo bencénico por cualquiera de las rutas metabólicas citadas o, en algunos casos, por desulfonación reductiva del anillo.

2.4.5. RELACIÓN ENTRE ESTRUCTURA Y BIODEGRADABILIDAD

En el caso de los tensioactivos y otras moléculas orgánicas como los pesticidas, es ampliamente conocido el hecho de que una ligera modificación en la estructura de la molécula condiciona la susceptibilidad a la destrucción de ésta en el medio ambiente (Alexander, 1994).

Es evidente que compuestos de corta vida son destruidos microbiológicamente, pequeñas alteraciones en la estructura química, tales como la sustitución de un átomo, pueden alterar la adecuación de las moléculas como sustratos para el crecimiento o metabolismo de los microorganismos reinantes en el medio.

Debido a la enorme importancia económica de los tensioactivos y a su contribución al deterioro ambiental si éstos persisten en el medio ambiente, se han desarrollado numerosos estudios encaminados a establecer las características estructurales que gobiernan la susceptibilidad de estas moléculas para ser degradadas.

2.4.5.1. Alcoholes grasos etoxilados

La biodegradación de alcoholes grasos etoxilados ha sido estudiada ampliamente por numerosos investigadores, aunque se ha prestado escasa atención a la determinación y cuantificación de los posibles biointermediatos, debido a la gran complejidad de la

composición de los compuestos de partida. La biodegradación primaria y final ha sido determinada en la mayoría de los casos utilizando métodos de medida no específicos tales como: eliminación de carbono orgánico disuelto, demanda bioquímica de oxígeno, consumo de oxígeno o producción de CO₂. Solo en algunos casos se han empleado técnicas específicas como resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas para identificar metabolitos (Marcomini, 2000).

El factor que afecta de forma más importante a la biodegradabilidad de alcoholes grasos etoxilados es la estructura hidrófoba y en particular la linealidad del esqueleto carbonado, que tiene una influencia mayor que otros factores tales como la longitud de la cadena alquílica, el tipo de enlace a la cadena etoxilada y su longitud.

Los alcoholes etoxilados lineales se caracterizan como “fácilmente biodegradables”. La biodegradación primaria, detectada mediante métodos analíticos específicos, es usualmente rápida y completa. La biodegradación final medida como consumo de oxígeno, o mediante otro procedimiento adecuado, suele ser bastante extensa (Swisher, 1987).

El efecto de la ramificación de la cadena alquílica sobre la biodegradación se ha demostrado claramente por la comparación de un AGE lineal C₁₂-C₁₅ que contiene 9 OE con un alcohol altamente ramificado C₁₃ que contiene 7 OE. El alcohol lineal etoxilado alcanzó valores superiores al 80% de la biodegradación en 28 días, en cambio, el alcohol etoxilado ramificado alcanzó únicamente un 40% de biodegradación (Kravetz, 1991). Además la facilidad de biodegradación de alcoholes etoxilados ramificados aumenta con el número de unidades etoxi en la molécula (Siegfried, 1993).

Los alcoholes etoxilados lineales se eliminan principalmente mediante el mecanismo de escisión central de la molécula de tensioactivo (Swisher, 1987). Posteriormente se ha confirmado este mecanismo debido a la biodegradación preferente de alcoholes etoxilados con cadenas cortas etoxiladas que no podría ser observado en el caso de ω,β -oxidación de la cadena alquílica (Marcomini, 2000).

Bajo condiciones anaerobias, la biodegradación de los alcoholes grasos etoxilados presenta comportamientos diferenciados en función del tamaño de cadena carbonada y del número de unidades etoxi (Mezzanotte, 2002). El mecanismo principal de eliminación de tensioactivos con un número de unidades etoxi de 2 es la adsorción en lodo, mientras que para los AGE más solubles (OE = 7) la biodegradación desempeña un papel principal.

2.4.5.2. Nonilfenoles Polietoxilados

Para los tensioactivos nonilfenol polietoxilados se pueden diferenciar estructuralmente tres elementos: la cadena alquílica, el grupo aromático y la cadena polietoxilada, a continuación se describe de qué manera influye cada uno de estos elementos en la biodegradación de los NPEO:

- 1. La cadena alquílica:** Según Kravetz, (Kravetz, 1991), la biodegradabilidad de los APEO_S viene determinada principalmente por la cadena alquílica, obteniéndose porcentajes de biodegradación menores en el caso de presencia de cadena alquílica ramificada. Igualmente Kravetz y col, 1991, realizaron estudios acerca de la influencia de la estructura del grupo hidrófobo y su longitud en la biodegradación de los APEOs obteniendo las siguientes conclusiones:
 - ❑ Los APEO_S lineales son más biodegradables que los ramificados.
 - ❑ Cuanto mayor es el grado de ramificación de la cadena alquílica, mas lentamente ocurre el proceso degradativo.
 - ❑ Al incrementarse el grado de ramificación, menor es la extensión de la biodegradación.
 - ❑ A elevadas concentraciones de tensioactivo o baja temperatura, la extensión de la biodegradación de los APEO_S ramificados disminuye considerablemente con respecto a las condiciones normales de operación.
- 2. El grupo aromático:** La presencia de un grupo aromático también afecta negativamente a la biodegradación (Sivak, 1982). La posición de la cadena alquílica en el anillo bencénico influye en la velocidad de degradación de manera que el acoplamiento del grupo aromático al carbono primario de la cadena alquílica da lugar a velocidades de biodegradación mayores (Little, 1977). Por otro lado, según estudios de Patozca, (Patozca, 1990), realizados en plantas de lodos activos a escala de laboratorio, la biodegradación de los APEO_S es de menor extensión y velocidad en el producto con base aromática.

3. **La cadena polietoxilada:** La velocidad de degradación de los APEO_s está influenciada por el número de unidades etoxiladas. Así, un incremento en el número de unidades etoxiladas provoca una disminución de la velocidad de degradación (Little, 1977; Sivak, 1982). La longitud de cadena necesaria para que tenga lugar la inhibición depende de la relación cadena etoxilada/cadena alquílica, es decir, de su balance hidrófilo/lipófilo (Dobarganes, 1975).

2.4.5.3. Alquilpoliglucósidos

Debido al hecho de que los alquilpoliglucósidos son tensioactivos relativamente nuevos, hay pocos estudios en relación a sus propiedades ecotoxicológicas. García y col. (García, 1997) estudió la biodegradabilidad aerobia de APG comerciales con distinto grado de polimerización y cadena alquílica. Los ensayos de biodegradabilidad utilizados fueron el ensayo en reactor cerrado, el ensayo estático modificado y un ensayo de simulación en plantas de tratamiento de aguas residuales. En el ensayo en reactor cerrado los APG ensayados alcanzaron un grado de mineralización del 80%, en el ensayo estático modificado, a pesar de las condiciones ten estrictas de trabajo (baja concentración de inóculo), el porcentaje de eliminación alcanzado fue del 100%. Se concluye por tanto que los APG son “fácilmente biodegradables”. Además los APG de mayor cadena se degradan más rápidamente (Eichhorn, 1999).

Por otra parte, estudios de biodegradación aerobia en ensayos de simulación de plantas de tratamiento de aguas residuales permiten asegurar una elevada biodegradación primaria y una extensa biodegradación última bajo condiciones reales de plantas de tratamiento de aguas residuales (Steber, 1995).

2.4.5.4. Lineal alquilbenceno sulfonatos

La biodegradación primaria de los diferentes homólogos del LAS (normalmente entre C₁₀ y C₁₃, pero incluso entre C₆ a C₁₆), en general aumenta a medida que lo hace la longitud de la cadena alquílica (Swisher, 1987). De la misma forma, para los distintos isómeros, a medida que aumenta la distancia entre el grupo sulfofenil y el extremo metilo

terminal de la cadena, la degradación es más rápida. Este efecto es conocido como el principio distancia (Swisher, 1963).

Sin embargo, hay excepciones a estas reglas generales, y parece ser que los factores determinantes de las velocidades relativas de degradación son complejos e interactivos (Perales, 2001). Entre ellos están:

- ❑ La concentración de los isómeros y homólogos del LAS
- ❑ Los posibles efectos inhibitorios del LAS
- ❑ La presencia de otros homólogos e isómeros
- ❑ La concentración de sólidos en suspensión
- ❑ El grado de aclimatación del inóculo

En la biodegradación de los tensioactivos aniónicos también hay que tener en cuenta un factor importante que es la ramificación de la cadena alquílica. Hammerton (1955; 1956), sugirió después de diversos estudios con los alquilbenceno y alquil-sulfatos, que el factor más importante no solo en la velocidad, sino también en la extensión de la biodegradación, era la linealidad del grupo hidrófobo, y que la naturaleza química, además del modo de ataque a este grupo, eran solo factores de menor importancia, llegando a la conclusión de que los tensioactivos lineales como el LAS eran fácilmente degradables mientras que los ramificados no.

De modo general, para tensioactivos aniónicos, en cuanto a la relación entre estructura química y biodegradación, es posible indicar las siguientes conclusiones:

- ❖ La naturaleza del grupo hidrófilo no tiene excesiva importancia en la biodegradación. En igualdad de condiciones, los más biodegradables son los que poseen grupo carboxílico, seguidos de los del grupo sulfato y por último los del grupo sulfonato.
- ❖ Cuanto mayor sea la distancia entre el grupo sulfonato (si se trata de este grupo) y el extremo final de la cadena, mayor es la biodegradabilidad (principio distancia).
- ❖ El principal factor que determina la biodegradabilidad es la estructura del grupo hidrófobo. La biodegradabilidad está favorecida por un aumento de la

linealidad del grupo hidrófobo, y deteriorada por su ramificación. Sin embargo, si la ramificación de la cadena está próxima al grupo hidrófilo, el tensioactivo es degradado a pesar de ser ramificado. Esto es debido a que las bacterias atacan al tensioactivo empezando por el extremo opuesto al grupo hidrófilo. La destrucción de la cadena se paraliza cuando se llega a un carbono terciario.

2.5. TOXICIDAD

2.5.1. INTRODUCCIÓN

Bajo este epígrafe el término toxicidad se limita estrictamente a los efectos tóxicos causados por los tensioactivos en el medio acuático, es decir, hablamos de toxicidad acuática. Quedan por tanto al margen los posibles efectos adversos que se puedan provocar en otras áreas, como son la irritación de la piel y la ingestión accidental.

Cabe destacar que existe una gran diferencia en la realización de los ensayos de toxicidad en cuanto se refiere a llevarlos a cabo a un nivel de laboratorio o en el medio acuático real. En el primer caso, se establecen unas condiciones patrón, mientras que en el segundo caso (ecotoxicidad), ejercen una gran influencia en los resultados una serie de variables tales como: temperatura, oxígeno disuelto, pH, sólidos en suspensión, etc...

La toxicidad acuática de productos tensioactivos se estudia básicamente a través de dos tipos de ensayo bien diferenciados: toxicidad aguda y toxicidad crónica.

Con el ensayo de toxicidad crónica se trata de determinar la concentración de una sustancia potencialmente tóxica, que causa algún efecto adverso durante una larga exposición a lo largo de la vida o ciclo biológico de una determinada especie. En el ensayo se observa la mortalidad producida, retrasos en el crecimiento, pérdida de peso, deformaciones, efecto sobre la reproducción, etc. Los ensayos suelen realizarse sobre peces, daphnias y algas.

La toxicidad aguda trata de determinar la concentración de un compuesto químico que produce un efecto adverso a corto plazo (normalmente entre 24 y 96 horas) en un grupo de organismos, tras una exposición de los mismos al compuesto que es potencialmente tóxico.

La evaluación de la toxicidad se realiza a través de las correlaciones entre sucesivas dosis del compuesto tóxico y el efecto adverso producido. Las medidas comúnmente empleadas son la EC_{50} y la LC_{50} , definidas como la concentración del producto que inactiva o causa la mortalidad, respectivamente, del 50% de los organismos con los que se ensaya (Sánchez-Leal, 1995).

Existe una gran gama de especies utilizadas en estos ensayos de toxicidad: alevines de peces (trucha y gripis), microcrustáceos (*Daphnia*, *Artemia*, *Gammarus*), algas (*Chlorella*, *Selenastrum*) y bacterias (*Photobacterium* y *Spirillum*).

La experiencia demuestra que los ensayos de toxicidad con peces son excesivamente costosos y laboriosos, y que el ensayo frente a algas exige unas instalaciones muy específicas y un personal de gran especialización. Por ello, basado en las ventajas de su rapidez, sencillez y economía, se elige como método de ensayo el método con bacterias luminiscentes.

Este ensayo está perfectamente descrito en la bibliografía (Bulich, 1979; Ribó, 1992); y está ganando gran aceptación para la determinación rápida y simple de la toxicidad de compuestos químicos en aguas superficiales y residuales, así como en extractos de matrices sólidas. Esto explica el hecho de que juntamente al ensayo de *Daphnias*, figure como bioensayo homologado para la caracterización de residuos tóxicos y peligrosos (BOE, 1989), habiéndose comercializado en forma de *kit* bajo diversas marcas registradas (Microtox, LumiStox, etc...).

La bibliografía existente en torno a la toxicidad medioambiental acuática de tensioactivos es abundante, aunque resulta difícil unificar criterios por la gran variedad de especies empleadas y por las diversas condiciones en que se realizan la mayoría de los ensayos. No obstante, en algunos trabajos publicados se recogen, en forma de tablas, datos de toxicidad de productos tensioactivos y del resto de componentes de una formulación detergente.

2.5.2. RELACIÓN ENTRE ESTRUCTURA Y TOXICIDAD

La toxicidad es muy dependiente de la longitud de la cadena hidrocarbonada y/o etoxilada, así como de la pureza de los compuestos químicos ensayados (Wong, 1997). De

forma general, la toxicidad de los tensioactivos para células y animales acuáticos aumenta con la longitud de cadena etoxilada, aunque esta tendencia puede disminuir para longitudes de cadena de 14 átomos de carbono (Sandbacka, 1999).

Kimerle, (Kimerle, 1977) al estudiar la toxicidad para los homólogos del LAS encontró que la toxicidad aguda se incrementa al aumentar la longitud de la cadena hidrocarbonada como se aprecia en la Tabla II. 12 donde se muestra la IC₅₀ para los diversos homólogos del LAS.

Tabla II. 12.- Valores de IC₅₀ (mg/L) de diversos homólogos del LAS frente a *Daphnia Magna*

HOMÓLOGO	IC ₅₀ , mg/L	HOMÓLOGO	IC ₅₀ , mg/L
Fenil C ₁₀	30-50	Fenil C ₁₃	5-10
Fenil C ₁₁	20-30	Fenil C ₁₄	1-3
Fenil C ₁₂	8-20		

Siendo IC₅₀ la concentración que provoca efecto sobre el 50% de la población ensayada de *Daphnia Magna*.

En general, los tensioactivos aniónicos de cadena lineal suelen presentar mayor toxicidad aguda que los de cadena ramificada, si bien este efecto se ve compensado por una mayor biodegradabilidad de los primeros (Kimerle, 1977).

Para el caso específico del LAS, la toxicidad disminuye para los isómeros con el anillo aromático más lejos del extremo de la cadena alquílica, es decir, que los 2-fenilos son más tóxicos que los isómeros centrales (Vandoni, 1973; Huddleston, 1963).

La toxicidad de los tensioactivos no iónicos del tipo polietoxilados, se ve incrementada al disminuir la longitud de la cadena etoxilada (Swisher, 1963; Ahel, 1985).

Comparando la toxicidad de los alcoholes grasos etoxilados con los de los alquifenoles etoxilados, estos últimos resultan menos tóxicos (García, 1994), si bien sus productos resultantes de la degradación (nonilfenol sin etoxilar o con bajo grado de etoxilación) parece que son un tanto “recalcitrantes”, por cuanto su biodegradación es más lenta que la de los correspondientes homólogos de alcoholes grasos sin etoxilar con 1 ó 2 unidades de óxido de etileno.

La Tabla II. 13 muestra para una serie de alcoholes grasos etoxilados y de nonilfenoles etoxilados, los valores de toxicidad frente a bacterias luminiscentes y frente a la *Daphnia Magna* (Ribosa, 1993).

Tabla II. 13.- Datos comparativos de toxicidad frente a bacterias luminiscentes (EC_{50}) y frente a *Daphnia Magna* (IC_{50}) para alcoholes grasos y nonilfenoles etoxilados

UNIDADES DE OE	ALCOHOL GRASO C ₁₂ -C ₁₄		NONILFENOL	
	EC ₅₀ (mg/L)	IC ₅₀ (mg/L)	EC ₅₀ (mg/L)	IC ₅₀ (mg/L)
2	0.1	1.3	8	2.5
6	0.6	2.1	100	7.6
8	1.6	3.0	150	14.0
10	3.5	4.6	325	19.1

En términos generales se puede decir que hay una serie de criterios comunes aplicables a cualquier tipo de tensioactivo (Sánchez-Leal, 1995):

1. La toxicidad que presentan los tensioactivos en aguas limpias resulta ser mayor que en aguas contaminadas, debido a la adsorción de los tensioactivos sobre la materia orgánica en suspensión de éstas últimas, con lo que se reduce la cantidad de tensioactivo en disolución.

2. Los metabolitos generados en el proceso de la biodegradación resultan menos tóxicos que los productos de partida, con algunas excepciones, como el caso de los alquilfenoles etoxilados.

3. Existe una relación entre la biodegradación y la toxicidad, por cuanto **los productos más tóxicos resultan ser los más fácilmente biodegradables.**

4. La toxicidad de los tensioactivos se debe, fundamentalmente, a la desestructuración que producen las membranas celulares, lo que provoca un shock osmótico y unas alteraciones de la permeabilidad de las células; por ello se explica que la mayoría de los tensioactivos resulten más tóxicos para especies de mayor organización biológica como peces que para las *Daphnias*.

2.6. LEGISLACIÓN SOBRE TENSIOACTIVOS

Del primer tensioactivo que se fabricó en Alemania durante la 1ª Guerra Mundial y comercializado con el nombre de NEKAL (un isopropil naftalen sulfonato sódico), se pasó posteriormente, durante la década de los cincuenta a los alquilbenceno sulfonatos ramificados (ABS), tensioactivos que alcanzaron un extraordinario desarrollo debido a su menor coste de producción y sus mejores propiedades deterativas, y entre ellos el TBS. Paralelamente se produjo un aumento de la concentración de tensioactivos en las aguas, aumento que se debía a la compleja estructura molecular ramificada de estos compuestos que los hacía difícilmente biodegradables.

Más tarde, en los inicios de los sesenta, las concentraciones de tensioactivos eran tan altas que la espuma que ocasionaban era demasiado visible y la vida acuática empezó a verse seriamente afectada (Willing, 2000), así que los TBS fueron sustituidos por los LAS ya que eran tensioactivos con similares o mejores propiedades y ambientalmente más lábiles.

El cambio de materia prima en la formulación de los detergentes dió resultados bastante sorprendentes. Se encontró que el fenómeno de la detergencia, empleando LAS, era mejor que cuando se usaba TBS. Por otra parte, las consecuencias ambientales fueron claras: el río Necker, primer río alemán donde se observó la espumación, pasó de presentar concentraciones a principios de los años 60 de hasta 0.7 mg/L de tensioactivos aniónicos, a reducirse por debajo de la mitad (Swisher, 1987). Aunque ésto no significó el fin de la espuma en los lugares citados, puesto que ésta además de ser producida por los detergentes, puede deberse a otras causas, sí se produjo un descenso apreciable en las espumas.

Es necesario resaltar, no obstante, que fue la primera vez que se producía un cambio importante en la formulación de un producto químico para contribuir a la mejora de la calidad de las aguas.

Ante esta situación, los gobiernos de diferentes países comenzaron a establecer legislaciones al objeto de limitar el empleo de agentes tensioactivos duros. Paralelamente y de “motu proprio”, por un lado mediante *Gentelman Agreements*, como en el Reino Unido, y por otro para evitar legislaciones más duras, la Asociación Americana de Productos

Tensioactivos, en la que estaban representadas las grandes industrias del sector, realizaron grandes esfuerzos tanto económicos como de investigación en el desarrollo de tensioactivos que fuesen más biodegradables, además, a los diferentes componentes que integran la formulación de un detergente se les obligó a pasar una serie de controles para asegurarse de que fuesen ecológicamente aceptables.

La sustitución de tensioactivos duros del tipo TBS por tensioactivos blandos se facilitó por el uso de métodos de biodegradación en laboratorio para asegurar que los nuevos tensioactivos eran más degradables que los anteriores. Importantísimo fue el papel de la OCDE (OECD, 1976) en estandarizar estos métodos.

2.6.1. LEGISLACIÓN EN EL ÁMBITO EUROPEO

La primera legislación, que fue establecida en Alemania en el año 1961 para evitar los problemas anteriores, exigía que la biodegradabilidad de los tensioactivos aniónicos fuese del 80%. En 1973, la Comunidad Económica Europea publicó dos directivas (73/404/CEE) y (73/405/CEE) relativas a la biodegradabilidad de tensioactivos utilizados en las formulaciones detergentes (CEE, 1973, a, b).

La **Directiva 73/404/CEE**, también llamada Directiva “marco” afirma en su *Artículo 2*: que “los Estados miembros prohibirán la comercialización y el empleo de los detergentes cuando la biodegradabilidad media de los tensioactivos que contengan sea inferior al 90 %, en cada una de las categorías siguientes: aniónicos, catiónicos, no iónicos y anfólitos. El empleo de tensioactivos cuyo índice medio de biodegradabilidad sea, por lo menos, igual al 90 % no deberá perjudicar, en condiciones normales de uso, la salud del hombre o de los animales”.

Hay dos puntos de particular interés en este artículo:

1. No es una Directiva general para la biodegradación de tensioactivos y solo es aplicable a tensioactivos utilizados en formulaciones detergentes.
2. La biodegradabilidad de tensioactivos individuales no está regulada, pero sí la biodegradabilidad de los tensioactivos de las clases especificadas (aniónicos, no iónicos, etc...).

Esta Directiva se puso al día en la **Directiva** del Consejo **82/242/CEE** (CEE, 1982b) en la que se fija un nivel mínimo de degradación del **80% para tensioactivos no iónicos**. También introduce una excepción en su *Artículo 5* con vistas a la utilización temporal de determinados tensioactivos. La última modificación a esta directiva la constituye la **Directiva** del Consejo **86/94/CEE** (CEE, 1986).

La **Directiva 73/405/CEE**, examina los procedimientos por los que la biodegradabilidad de tensioactivos aniónicos contenidos en los detergentes puede ser determinada. Estos procedimientos se dividen en dos partes: la primera se refiere a la extracción de los detergentes aniónicos de las formulaciones detergentes, y la segunda, se refiere al procedimiento de medida de la biodegradabilidad que se basa en el método de análisis de MBAS. Resulta claro en esta directiva que las regulaciones y el control se ejercen sobre el producto detergente y no sobre los componentes individuales del mismo, además el método analítico evalúa MBAS totales en el producto sin discriminar entre los tensioactivos individuales. Es por tanto la directiva marco la que especifica ampliamente las clases de tensioactivos para su control y regularización.

En la práctica sin embargo, el control sobre el detergente lo ejerce el propio fabricante que realiza los ensayos oportunos en los tensioactivos individuales que utiliza en sus formulaciones.

Esta Directiva se puso al día en la **Directiva** del Consejo **82/243/CEE** (CEE, 1982a), que contiene una serie de puntos adicionales:

1. En su *Artículo 2* afirma que los Estados miembros prohibirán la comercialización y el empleo de los detergentes cuando la **biodegradabilidad media de los tensioactivos aniónicos sea inferior al 80 %**. Este nivel del 80% está en contradicción con la directiva marco que especificaba al menos un 90% de degradación. La razón que se afirma para esta contradicción en la Directiva 82/242/CEE es que “deben fijarse los márgenes de tolerancia adecuados en la determinación del índice de biodegradabilidad con el fin de evitar que las inexactitudes de los métodos de control pudieran conducir a decisiones de rechazo que tendrían consecuencias económicas importantes”.
2. El *Artículo 2* continua especificando los métodos para determinar la biodegradabilidad de tensioactivos aniónicos contenidos en un

detergente, tales como el método de la OCDE (OCDE, 1976), el método alemán, el método francés y el método del Reino Unido.

Por otra parte, en el ámbito de la Unión Europea la política de prevención y control de los productos químicos está coordinada por las Directivas y Reglamentos que regulan las sustancias y preparados químicos peligrosos. Los cuatro instrumentos jurídicos básicos y de carácter horizontal que regulan los productos químicos en la Unión Europea son:

Directiva 67/548/CEE del Consejo sobre aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los Estados Miembros relativas a la clasificación, envasado y etiquetado de las sustancias peligrosas. (Real Decreto 363/1995, de 10 de marzo).

Directiva 1999/45/CEE del Consejo, sobre la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los Estados Miembros relativas a la clasificación, envasado y etiquetado de preparados peligrosos. (Real Decreto 255/2003, de 28 de Febrero).

Reglamento CEE nº 793/93 del Consejo, sobre evaluación y control del riesgo de sustancias existentes.

Directiva 76/769/CEE relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los Estados Miembros que limitan la comercialización y el uso de determinadas sustancias y preparados peligrosos. (Real Decreto 1406/1989, de 10 de noviembre).

Toda esta normativa regula las sustancias y preparados químicos peligrosos y se basa en los siguientes principios: unificación de los criterios de clasificación, envasado y etiquetado de las sustancias y preparados químicos peligrosos, protección de la salud y seguridad de la población consumidor y usuario profesional, evaluación del riesgo de las sustancias y preparados en todo su ciclo de vida, sistema armonizado de información al ciudadano mediante el etiquetado y las fichas de datos de seguridad, procedimiento común y normalizado de intercambio de información, y limitación o prohibición de sustancias y preparados en el mercado europeo.

Existe legislación en este ámbito desde 1967, fecha en que se reconoció que las disposiciones sobre clasificación, envasado y etiquetado de sustancias en el mercado, especialmente de los productos químicos industriales peligrosos, debía armonizarse en la Comunidad para eliminar las barreras comerciales que podían suponer las disposiciones

nacionales de los Estados Miembros. Desde entonces se han adoptado una serie de instrumentos legislativos comunitarios para alcanzar y mantener un alto nivel de protección de la salud humana y del medio ambiente en el contexto del mercado interior.

El requisito de protección del medio ambiente se introdujo en la legislación en 1979. Al mismo tiempo, para garantizar un control de los productos químicos comercializados, se decidió establecer un sistema de notificación para las "nuevas" sustancias a partir de 1981.

Desde su adopción en 1967, la Directiva 67/548/CEE ha sido modificada ocho veces y adaptada al progreso técnico en veintiocho ocasiones. Por su parte, la Directiva 76/769/CEE, hasta la fecha, ha sido modificada en 26 ocasiones.

Mediante la propuesta de Reglamento COM (2002) 485 relativo a detergentes: Biodegradabilidad y etiquetado de detergentes, el Parlamento Europeo propone modernizar la legislación europea sobre los tensioactivos contenidos en los detergentes con el fin de reforzar la protección del medio acuático contra los efectos nocivos de estas sustancias, y mejorar la información proporcionada a los consumidores a un coste razonable para las empresas. Además la propuesta tiene por objetivo permitir la libre circulación de detergentes en el mercado interior y modernizar las directivas existentes sobre los detergentes en cuanto a la biodegradabilidad de los tensioactivos y la protección del medio ambiente en este ámbito.

Asimismo, la comisión propone que, para los productos regulados por dicha propuesta de reglamento, sea obligatorio el cumplimiento de las obligaciones enunciadas en la recomendación 89/542/CEE relativa al etiquetado de detergentes y productos de limpieza así como el suministro a los consumidores de información específica sobre ingredientes perfumantes.

Esta propuesta de la Comisión deroga las directivas 73/404/CEE, 73/405/CEE, 82/242/CEE, 82/243/CEE, 86/94/CEE y la recomendación 89/452/CEE.

Los nuevos ensayos de determinación de la biodegradabilidad propuestos garantizan un nivel de protección del medio ambiente más elevado, y son aplicables a todos los tipos de tensioactivos de los detergentes. La definición de detergente que se propone amplía el ámbito de aplicación de la legislación actual para abarcar otros usos similares, además se introduce la definición de tensioactivos que no existía en la legislación anterior.

En este reglamento se establecen los métodos de ensayo y analíticos para evaluar la biodegradabilidad primaria de los tensioactivos: aniónicos, no iónicos, catiónicos y anfotéricos. Los principales cambios en relación con la legislación existente tienen la finalidad de abarcar, por primera vez, los tensioactivos catiónicos y anfotéricos y también los aniónicos y no iónicos que no reaccionan en los ensayos incluidos en la legislación existente anterior a este reglamento. Se exige el uso de análisis instrumental en el caso de tensioactivos que no reaccionen a los métodos semiespecíficos, de manera que todos los tensioactivos estén cubiertos.

La biodegradabilidad primaria se considerará satisfactoria en un nivel mínimo del 80% para el ensayo de referencia propuesto, que se basa en el procedimiento de ensayo de confirmación del método de la OCDE (OECD, 1976). Los métodos de análisis para tensioactivos aniónicos y no iónicos son el método de análisis de sustancias activas al azul de metileno (MBAS) y el método de análisis de sustancias activas al bismuto (BiAS) respectivamente.

En cuanto a la biodegradabilidad final, el ensayo de referencia es el ensayo de espacio de cabeza de CO₂. Dependiendo de las características físicas del tensioactivo, se podrán utilizar otros métodos para medir la biodegradabilidad final como el método de desaparición del carbono orgánico disuelto (COD) en el que no se utilizará adaptación previa ni se aplicará el principio de los 10 días. La biodegradabilidad medida de conformidad con el ensayo se considerará adecuada si alcanza como mínimo el 70% en un plazo de 28 días.

2.6.2. LEGISLACIÓN EN EL ÁMBITO ESTATAL

En España, la Legislación (BOE., 1985) especifica que la biodegradabilidad de un producto tensioactivo aniónico ha de ser de un 80% del porcentaje de biodegradación de un dodecil-benceno sulfonato sódico lineal.

Para los vertidos resultantes de la actividad industrial a los cauces públicos, el límite de concentración en tensioactivos aniónicos está en el margen de 2-6 mg/L, dependiendo de las características del entorno (BOE, 1986); en cambio, para los vertidos industriales a la red de alcantarillado y que, por tanto, han de someterse posteriormente a un tratamiento en EDARs, se admiten valores límites de concentración de tensioactivos

más elevados, en el margen 10-30 mg/L, dependiendo de las Administraciones locales, y en su defecto, de las Comunidades Autónomas (Sánchez-Leal, 1995).

La concentración límite admisible para el contenido de tensioactivos en aguas superficiales continentales empleadas en la obtención de agua potable para el consumo público, está entre 0.2 y 0.5 mg/L, según el tipo de tratamiento a que se someta (BOE, 1988). Para aguas ya tratadas que se destinan a consumo público, la reglamentación establece una concentración límite de tensioactivos aniónicos de 0.2 mg/L (BOE, 1990).

La legislación española sobre etiquetado de sustancias y preparados peligrosos proviene en su mayor parte de una adopción de las disposiciones comunitarias. La referente al etiquetado en transporte, sin embargo, es reflejo de convenios internacionales. Existen, además, algunas disposiciones de la Comunidad Económica Europea que todavía no han sido adoptadas por la normativa española.

La elaboración de la normativa sobre sustancias y preparados químicos es competencia del Ministerio de Sanidad y Consumo, en coordinación con los Ministerios de Medio Ambiente, Industria y Energía, Trabajo y Asuntos Sociales y Agricultura, Pesca y Alimentación.

El **Real Decreto 2816/1983**, de 13 de octubre, aprobó la Reglamentación técnico-sanitaria para la elaboración, circulación y comercio de los detergentes. Teniendo en cuenta, que los productos en ella regulados han sufrido, en los últimos años, importantes innovaciones, técnicas y comerciales y, además, la entrada en vigor del **Real Decreto 1078/1993**, de 2 de julio, por el que se aprueba el Reglamento sobre clasificación, envasado y etiquetado de preparados peligrosos, y la aprobación del Real Decreto **363/1995**, de 10 de marzo, por el que se aprueba el Reglamento sobre notificación de sustancias nuevas y clasificación, envasado y etiquetado de sustancias peligrosas (BOE, 1995), se hizo necesario llevar a cabo una actualización de la Reglamentación técnico-sanitaria.

Se consideró oportuno extender el ámbito de aplicación de la Reglamentación técnico-sanitaria hacia otros productos cuya fabricación, comercialización y aplicaciones son similares a los detergentes. Asimismo, se establecieron requisitos especiales de formulación y etiquetado para ciertos lavavajillas líquidos con el fin de mejorar su seguridad. Finalmente mediante el **Real Decreto 770/1999**, de 7 de mayo, se aprueba la

Reglamentación técnico-sanitaria para la elaboración, circulación y comercio de detergentes y limpiadores (BOE, 1999).

2.6.3. LEGISLACIÓN EN EL ÁMBITO DE LA COMUNIDAD AUTÓNOMA ANDALUZA

En la Comunidad Autónoma Andaluza el **Decreto 14/1996**, de 16 de Enero, aprobó el reglamento de calidad de las aguas litorales (BOJA, 1996). Tras definir el marco normativo de actuación para preservar y mejorar la calidad de las aguas litorales en la Ley de Protección Ambiental de la comunidad andaluza, se establecen los límites de vertido y los métodos de análisis correspondientes. En el Anexo I del Reglamento se establece que no podrán autorizarse vertidos al dominio público marítimo-terrestre cuya carga contaminante en detergentes supere los límites siguientes: 5 mg/L (media mensual); 20 mg/L (media diaria) y 50 mg/L (valor puntual). Como método de análisis para detergentes se especifica la espectrofotometría de absorción molecular con un límite de detección de 0.001 mg/L. Se trata por tanto de una legislación general que no distingue entre los distintos tipos de tensioactivos y que únicamente contempla un método de análisis de biodegradabilidad primaria y no final.

En 1997 se publica la Orden de la Consejería de Medio Ambiente de 14 de Febrero de 1997, por la que se clasifican las aguas litorales andaluzas y se establecen los objetivos de calidad de las aguas afectadas directamente por los vertidos (BOJA, 1997). Con arreglo a las exigencias y limitaciones de vertidos establecidas en las normas comunitarias y en el ordenamiento español, se fijan para los detergentes los siguientes límites de vertido en función de la clasificación de las aguas: 100 µg/L (aguas especiales); 300 µg/L (aguas limitadas); 200 µg/L (aguas normales); 200 µg/L (aguas menos limitadas).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

En el presente capítulo se describen los principales materiales y métodos empleados en este trabajo. En el apartado 3.1 se indican los tensioactivos utilizados, así como sus propiedades y características. En el apartado 3.2. se describen los diferentes diseños experimentales, que se estructuran a su vez en: ensayos de biodegradabilidad, toxicidad de tensioactivos, y toxicidad durante el proceso de biodegradación. Los métodos de ensayo de la biodegradabilidad: ensayo estático o de selección y ensayo dinámico o de confirmación se recogen en el apartado 3.3. En el apartado 3.4. se muestran los métodos empleados para el análisis de tensioactivos y para el recuento de la biomasa, los parámetros de control y la determinación de los parámetros de calidad de un método analítico. En el apartado 3.5. aparece reflejado el estudio de la toxicidad y en el apartado 3.6. se establece el protocolo de limpieza empleado.

3.1. TENSIOACTIVOS UTILIZADOS

Los tensioactivos no iónicos empleados en este estudio son los alcoholes grasos etoxilados (AGE); Findet 10/15, Findet 10/18, Findet 1618A/18, Findet 1618A/23, Findet 1214N/16 y Findet 1214N/23, suministrados por Kao Corporation, S. A., Nonilfenol polietoxilado (NPEO) suministrado por Kao Corporation, S. A., los alquilpoliglucósidos (APG) GlucoPON 215 CS UP, GlucoPON 600 CS UP y GlucoPON 650 EC, de Henkel, además del Berol LFG61 (mezcla de alcoholes grasos etoxilados y alquilpoliglucósidos), proveniente de Akzo Nobel y el ácido graso etoxilado Findet AR/52 suministrados por Kao Corporation, S. A.

Como tensioactivo aniónico, se ensayó el alquilbenceno sulfonato lineal (LAS, C₁₁₋₁₄), de fórmula general $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{CH}_2(\text{C}_6\text{H}_4)\text{SO}_3^-$, suministrado por Kao Corporation, S.A.

Las principales características de estos tensioactivos se resumen en la Tabla III. 1, donde PM corresponde al peso molecular del producto, C al carbono, O al oxígeno, H al hidrógeno, N_C al tamaño de la cadena carbonada, DP al grado de polimerización, OE al número de unidades de óxido de etileno, HLB al balance hidrófilo-lipófilo, CMC a la concentración micelar crítica y CP al punto de enturbiamiento. Los valores de humedad fueron suministrados por los fabricantes de los tensioactivos, y el valor de CMC se obtuvo

de Sabahi (Sabahi, 2004). Los datos del análisis elemental del tensioactivo y el punto de enturbiamiento fueron proporcionados por Cuevas (Cuevas, 2001).

Tabla III. 1.- Propiedades de los tensioactivos utilizados

PRODUCTO	PM _{medio} ⁽³⁾ (g/mol)	ANÁLISIS ELEMENTAL (%) ⁽²⁾			ESTRUCTURA QUÍMICA ⁽¹⁾		
		C	H	O	N _c	DP	OE
Findet 10/15	272	66.16	14.00	19.84	C10	--	3
Findet 10/18	387	62.37	12.81	24.82	C10	--	6
Findet 1618A/18	603	66.82	14.26	18.92	C16 - C18	--	6
Findet 1618A/23	1386	59.49	11.76	28.75	C16 - C18		11
Findet 1214N/16	370	66.11	13.74	14.00	C12 (70%) C14 (30%)	--	4
Findet 1214N/23	630	61.13	12.56	26.31	C12 (70%) C14 (30%)	--	11
NPEO (9.5 OE)	--	--	--	--	--	--	--
GCP 215	376	35.61	10.20	54.19	C8 - C10	1.42	--
GCP 600	377	32.65	8.81	58.54	C12 - C14	1.59	--
GCP 650	383	29.09	10.88	59.83	C8 - C14	1.35	--
Berol LFG61	--	--	--	--	--	--	--
PRODUCTO	CP ⁽²⁾ (°C)	CMC (g/L) ⁽³⁾			HLB ⁽¹⁾	HUMEDAD ⁽²⁾ (%)	
		30°C	40°C	60°C			
Findet 10/15	46-50	--	--	--	9.2	24.0	
Findet 10/18	51-53	0.191	0.196	0.169	12.6	0.0	
Findet 1618A/18	71-75	--	--	--	10.2	1.0	
Findet 1618A/23	78-82	--	--	--	13.2	0.0	
Findet 1214N/16	60-65	--	--	--	9.5	2.1	
Findet 1214N/23	76.7-77.1	0.025	0.020	0.016	14.3	1.9	
NPEO (9.5 OE)	58.6	0.018	0.017	0.026	--	--	
GCP 215	--	1.012	0.974	0.960	12.6 ⁽⁴⁾	37.0	
GCP 600	--	0.050	0.048	0.051	12.7 ⁽⁴⁾	46.6	
GCP 650	--	0.153	0.124	0.126	12.8 ⁽⁴⁾	50.4	
LAS	--	0.129	0.194	0.718	--	--	
Berol LFG61		0.521	0.797	1.445	--	--	

⁽¹⁾ Datos suministrados por los fabricantes de los tensioactivos, ⁽²⁾ Datos obtenidos de Cuevas (2001), ⁽³⁾ Datos obtenidos de Sabahi (2004), ⁽⁴⁾ Datos obtenidos de Altmajer (2004).

3.2. DISEÑO EXPERIMENTAL

En la fase experimental del presente trabajo se han realizado un total de 34 ensayos de biodegradación agrupados en cinco categorías, de acuerdo con los objetivos que se pretendían alcanzar, y 13 ensayos de toxicidad para todos los tensioactivos utilizados. A continuación se describen las condiciones de cada uno de estos ensayos.

3.2.1. ENSAYOS DE BIODEGRADACIÓN

Con este primer bloque de experimentos se pretendió estudiar la biodegradabilidad primaria de los AGE, para ello se realizaron 16 ensayos de biodegradación bajo las condiciones recogidas en la Tabla III. 2, donde se indica el número de experimento, su identificación y las características del ensayo, esto es; método de ensayo empleado, tensioactivo, concentración inicial del ensayo, recuento de biomasa y control utilizado en el ensayo. En la misma Tabla III. 2 se incluye un experimento para medir la biodegradabilidad final para el AGE Findet 1618A/18. De la misma forma, en la Tabla III. 3 se recogen los experimentos realizados con el tensioactivo nonilfenol polietoxilado, y en la Tabla III. 4, Tabla III. 5 y Tabla III. 6 los ensayos realizados para los APG, LAS y mezclas de AGE y APG respectivamente.

En cuanto a las condiciones de ensayo (temperatura, luminosidad, nutrientes, etc.), estas son las mismas en todos los experimentos realizados y se recogen en el apartado correspondiente al método de ensayo de biodegradabilidad empleado (apartado 3.3.).

Tabla III. 2.- Diseño de experimentos para el estudio de la biodegradabilidad de AGE

n°	Nombre	MÉTODO DE ENSAYO	TENSIOACTIVO	CONC. (mg/L)	RECUESTO BIOMASA	CONTROL
1	F1	Estático	F10/15	5	--	Aniónico
2	F2	Estático	F10/18	5	--	Aniónico
3	F3	Estático	F1618A/18	5	Si	Aniónico
3	F4	Estático	F1618A/18	25	Si	Aniónico
5	F5	Estático	F1618A/18	50	--	Aniónico
6	F6	Estático	F1618A/23	5	Si	Aniónico
7	F7	Estático	F1214N/16	5	Si	Aniónico
8	F8	Estático	F1214N/16	25	Si	Aniónico
9	F9	Estático	F1214N/16	50	Si	Aniónico
10	F10	Estático	F1214N/23	5	--	Aniónico
11	F11	Estático	F1214N/23	15	Si	Aniónico
12	F12	Estático	F1214N/23	20	Si	Aniónico
13	F13	Estático	F1214N/23	25	--	Aniónico
14	F14	Estático	F1214N/23	50	Si	Aniónico
15	F15	Dinámico	F1618A/18	10	--	--
16	F16	Dinámico	F1214N/23	10	--	--
17	F17	Respirometría manométrica	F1618A/18	15	--	--
				25	--	--
				50	--	--

Tabla III. 3.- Diseño de experimentos para el estudio de la biodegradabilidad del NPEO

n°	Nombre	MÉTODO DE ENSAYO	TENSIOACTIVO	CONC. (mg/L)	RECUESTO BIOMASA	CONTROL
1	N1	Estático	NPEO	5	Si	Aniónico
2	N2	Estático	NPEO	25	Si	Aniónico
3	N3	Estático	NPEO	50	Si	Aniónico

Tabla III. 4.- Diseño de experimentos para el estudio de la biodegradabilidad de APG

n°	Nombre	MÉTODO DE ENSAYO	TENSIOACTIVO	CONC. (mg/L)	RECuento BIOMASA	CONTROL
1	G1	Estático	GCP 215	12	Si	Aniónico
2	G2	Estático	GCP 600	12	Si	Aniónico
3	G3	Estático	GCP 600	100	Si	Aniónico
4	G4	Estático	GCP 650	12	Si	Aniónico
5	G5	Estático	GCP 650	20	Si	Aniónico
n°	Nombre	MÉTODO DE ENSAYO	TENSIOACTIVO	CONC. (mg/L)		
					15	
					25	
5	RM1	Respirometría manométrica	GCP 215		50	
					75	
					100	
					15	
					25	
6	RM2	Respirometría manométrica	GCP 600		50	
					75	
					100	
7	RM3	Respirometría manométrica	GCP 650		50	

Tabla III. 5.- Diseño de experimentos para el estudio de la biodegradabilidad del LAS

n°	Nombre	MÉTODO DE ENSAYO	TENSIOACTIVO	CONC. (mg/L)	RECuento BIOMASA	CONTROL
1	L1	Estático	LAS	5	Si	Aniónico
2	L2	Estático	LAS	25	Si	Aniónico
3	L3	Estático	LAS	50	Si	Aniónico
4	L4	Estático	LAS	100	--	Aniónico

Tabla III. 6.- Diseño de experimentos para el estudio de la biodegradabilidad de mezclas de AGE y APG

n°	Nombre	MÉTODO DE ENSAYO	TENSIOACTIVOS	CONC. (mg/L)	RECuento BIOMASA	CONTROL
1	M1	Estático	F1214N/23 y GCP 650	10+10	Si	Aniónico
2	M2	Estático	F1214N/23 y GCP 650	15+5	Si	Aniónico

3.2.2. TOXICIDAD DE TENSIOACTIVOS

En la Tabla III. 7 se indican los ensayos realizados para el estudio de la toxicidad de diferentes tensioactivos según la técnica experimental indicada en el apartado 3.5. Se indica el número de experimento, su identificación y el tensioactivo utilizado.

Tabla III. 7.- Ensayos para el estudio de la toxicidad de diferentes tensioactivos

n°	Nombre	MÉTODO DE ENSAYO	TENSIOACTIVO
1	T1	Toxicidad	F10/15
2	T2	Toxicidad	F10/18
3	T3	Toxicidad	F1618A/18
4	T4	Toxicidad	F1618A/23
5	T5	Toxicidad	F1214N/16
6	T6	Toxicidad	F1214N/23
7	T7	Toxicidad	FAR/52
8	T8	Toxicidad	NPEO
9	T9	Toxicidad	LAS
10	T10	Toxicidad	GCP 215
11	T11	Toxicidad	GCP 600
12	T12	Toxicidad	GCP 650
13	T13	Toxicidad	BEROL

3.2.3. TOXICIDAD DURANTE EL PROCESO DE BIODEGRADACIÓN

En la Tabla III. 8 se recogen los ensayos realizados para el estudio de la toxicidad durante el proceso de biodegradación. Se indica el número de experimento, su identificación y el tensioactivo utilizado.

Tabla III. 8.- Ensayos para el estudio de la toxicidad durante el proceso de biodegradación

n°	Nombre	NOMBRE ENSAYO	MÉTODO DE ENSAYO	TENSIOACTIVO	CONC. (mg/L)
1	TB1	F5	Estático	F1618A/18	50
2	TB2	F6	Estático	F1618A/23	5
3	TB3	F7	Estático	F1214N/16	5
4	TB4	F8	Estático	F1214N/16	25
5	TB5	F11	Estático	F1214N/23	15
6	TB6	F12	Estático	F1214N/23	20
7	TB7	F13	Estático	F1214N/23	25
8	TB8	F14	Estático	F1214N/23	50
9	TB9	N1	Estático	NPEO	5
10	TB10	N2	Estático	NPEO	25
11	TB11	N3	Estático	NPEO	50
12	TB12	G1	Estático	GCP 215	12
13	TB13	G3	Estático	GCP 600	100
14	TB14	G5	Estático	GCP 650	20
15	TB15	L2	Estático	LAS	25
16	TB16	L3	Estático	LAS	50
17	TB17	M1	Estático	F1214N/23+GCP 650	10+10
18	TB18	M2	Estático	F1214N/23+GCP 650	15+5

3.3. MÉTODOS DE ENSAYO DE LA BIODEGRADABILIDAD

3.3.1. ENSAYO ESTÁTICO (ENSAYO DE SELECCIÓN)

Se utiliza este ensayo para determinar la biodegradabilidad de tensioactivos aniónicos y no iónicos. Viene recogido en la NORMA UNE 55-844-91 (UNE 55-844-91); “Determinación de la biodegradabilidad de agentes tensioactivos no iónicos empleados en la fabricación de formulaciones detergentes”.

El método especificado en esta norma y sus anexos se corresponde totalmente con el método para tensioactivos aniónicos y no iónicos que se detalla en el anexo I de la Orden del Ministerio de Industria y Energía del 5 de Septiembre de 1985 sobre “Actualización de la determinación de la biodegradabilidad de agentes tensioactivos utilizados en la preparación de los detergentes”, (BOE, 1985).

Por otra parte, éste método es el aprobado por la OCDE, (OECD, 1976). Las Directivas 82/242/CEE y 82/243/CEE del Consejo de las Comunidades Europeas,

reconocen como válido el citado método de la OCDE para determinar el índice de biodegradabilidad de los tensioactivos aniónicos y no iónicos contenidos en los detergentes (CEE, 1982a; 1982b).

3.3.1.1. Fundamento del método

Se trata de un ensayo tipo “matraz abierto” que permite determinar la biodegradabilidad de tensioactivos. Los tensioactivos que se ensayan deben superar un porcentaje mínimo requerido para concluir que son biodegradables y que pueden utilizarse en aplicaciones comerciales. Es un ensayo sencillo y relativamente rápido, puesto que dura 19 días como máximo y además puede efectuarse simultáneamente para diferentes tensioactivos o para diferentes concentraciones de un mismo tensioactivo.

Consiste en inocular una pequeña cantidad de microorganismos aerobios, procedentes de una población mixta y aireada, en una mezcla formada por la disolución nutriente, que es un medio acuoso de composición química definida apto para el desarrollo microbiano, y la disolución de ensayo, que contiene los tensioactivos que se deseen ensayar.

La disolución de ensayo debe estar libre de productos que puedan interferir en la determinación. Ciertos productos químicos, presentes en los medios acuosos o en el aire ambiente, pueden reducir, o incluso inhibir, la actividad de los microorganismos causantes de la biodegradación de los tensioactivos, retrasando el proceso o influyendo en el resultado final. Entre estos productos se encuentran álcalis fuertes, metales tóxicos, bactericidas y disolventes orgánicos. Incluso los propios tensioactivos pueden inhibir la actividad de los microorganismos si se encuentran presentes en concentraciones suficientemente elevadas (Jurado, 2004).

La muestra debe contener inicialmente una concentración de tensioactivo igual o superior a 5 mg/L y se coloca en un matraz cónico de 2 L de capacidad. El control de los microorganismos responsables de la biodegradación se comprueba mediante ensayos paralelos al tensioactivo problema, efectuados con tensioactivos aniónicos que sirven como patrones de biodegradación. El patrón aniónico utilizado ha sido el alquilbenceno sulfonato lineal (LAS, C₁₁₋₁₄). Se aplica a los matraces una agitación continua de tipo orbital a razón

de 125 carreras/vaivén que facilite la aireación de su contenido. La temperatura se mantiene a 25°C durante todo el ensayo.

3.3.1.2. Reactivos y disoluciones

Todos los productos químicos utilizados en el ensayo son de calidad P.A. “calidad para análisis” o P.R.S. “calidad del reactivo purísimo”, el agua es destilada o de pureza equivalente, en cualquier caso exenta de sustancias tóxicas, especialmente de productos que contengan cobre.

□ Disolución Nutriente

Esta disolución se prepara añadiendo a 1 L de agua destilada 1 ml de cada una de las cuatro disoluciones siguientes:

- a. Se disuelven en 1000 ml de agua las siguientes cantidades de productos:
 - 8.5 g de dihidrógenofosfato potásico (KH_2PO_4 , P.A.) de Panreac.
 - 21.75 g de monohidrógenofosfato dipotásico (K_2HPO_4 , P.A.) de Panreac.
 - 33.4 g de monohidrógenofosfato disódico dihidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, P.R.S.) de Panreac.
 - 1.7 g de cloruro amónico (NH_4Cl , P.R.S.) de Panreac.
- b. Se disuelven en 1000 ml de agua 22.5 g de sulfato magnésico heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, P.R.S.) de Panreac.
- c. Se disuelven en 1000 ml de agua 27.5 g de cloruro cálcico anhidro (CaCl_2 , P.A.) de Panreac.
- d. Se disuelven en 1000 ml de agua 0.25 g de cloruro de hierro (III) hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, P.R.S.) de Panreac.

La disolución nutriente se prepara inmediatamente antes de su uso en el ensayo de biodegradabilidad.

□ Disolución de tensioactivo a ensayar

Se prepara una disolución de tensioactivo no iónico de 1g/L (disolución madre) disolviendo éste en agua desionizada (calidad Milli-Q© con resistividad de 18.2

M Ω .cm equivalente a la del agua pura). Dependiendo del tensioactivo puede ser necesario someter la disolución a un ligero calentamiento. La disolución de concentración de tensioactivo requerida (entre 0-100 mg/L) se obtiene por dilución de la disolución madre en agua desionizada.

□ Disolución de tensioactivo aniónico (patrón blando)

Partiendo del ácido dodecibenceno sulfónico se obtiene por neutralización con NaOH (calidad P.A. de Panreac) hasta pH 7 una disolución de alquilbenceno sulfonato sódico de cadena lineal (LAS). A partir de una disolución madre de 1g/L de LAS se obtiene por dilución en agua desionizada una disolución hija de 5 mg/L que se empleará en el ensayo de biodegradabilidad.

□ Inóculo

Aunque puede considerarse como inóculo adecuado cualquier fuente que proporcione microorganismos aerobios de una población mixta, el inóculo debe proceder preferentemente de un efluente secundario de buena calidad, tomado de una planta de depuración de agua con tratamiento biológico (fangos activos), que opere con vertidos urbanos en forma predominante. El inóculo se tomó de la estación depuradora de aguas residuales urbanas “Los Vados” de Granada (EDAR “Los Vados”).

Es esencial al emplear el método por primera vez comprobar experimentalmente la actividad del inóculo, para ello se realizaron ensayos con el tensioactivo aniónico patrón (LAS) utilizando cantidades variables de inóculo. De esta serie de ensayos previos se dedujo la cantidad y el tipo de inóculo necesario para provocar una biodegradación del patrón empleado, que debe estar comprendida entre el 90% y 95% dentro de los primeros 14 días del ensayo, aunque normalmente solo se requieren de 7 a 10 días.

Se ensayaron dos tipos de inóculo: uno proveniente de fangos activados y otro del efluente secundario de la EDAR. Las cantidades ensayadas de ambos inóculos fueron: 5, 15 y 20 ml en 1.2 L de disolución nutriente, con 5 mg/L de tensioactivo aniónico. Los ensayos mostraron que en los 7 primeros días se había degradado el 100% del tensioactivo utilizando como inóculo agua tratada. Se descartaron los fangos activados como inóculo y cantidades de agua tratada mayores de 5 ml.

A continuación se ensayaron diferentes cantidades de inóculo proveniente del efluente secundario (0.5, 1 y 2 ml) sobre LAS. Los resultados revelaron que con 0.5 ml de inóculo a los 5 días se alcanza un 94 % de biodegradación para el tensioactivo aniónico. Por tanto, en todos los ensayos de biodegradación estática la cantidad de inóculo a utilizar es de 0.5 ml por 1200 ml de disolución nutriente, cumpliendo así los requisitos de la norma.

3.3.1.3. Equipos

A continuación se describen los equipos utilizados en el ensayo estático de biodegradabilidad.

Agitador orbital

En los ensayos estáticos de biodegradabilidad se utilizó el agitador orbital modelo Rotabit de SELECTA. Se trata de una máquina agitadora por vaivén con capacidad para seis matraces cónicos que permite efectuar hasta 220 carreras de vaivén por minuto, con un recorrido de 5 a 10 cm cada una.

pHstato

Sistema automático de valoración Titrino GP 736 de METROHM AG, que consta de: depósito para el agente valorante, bureta automática de 10 ó 20 ml, dosificador automático acoplado a la bureta y electrodo redox de platino/CIAg. El equipo dispone de software adecuado para realizar una valoración potenciométrica.

Espectrofotómetro

Espectrofotómetro de doble haz UV-Visible de teclado integrado y pantalla de cristal líquido con una lámpara halógena de tungsteno y otra de deuterio. Opera con longitudes de onda entre 194 y 1100 nm. Modelo Unican Helios Alpha&Beta de SPECTRONIC UNICAM.

Evaporador rotativo

Equipo utilizado en la determinación de tensioactivos por el método de Wickbold para la concentración de tensioactivos, permite la evaporación de agua en cantidades de 50 a 3000 ml. Modelo ROTAVAPOR R-110 de la casa BÜCHI.

Centrífuga

Utilizada para eliminar la materia en suspensión de las muestras a analizar. Permite trabajar en un rango de 0-8000 r.p.m. y hasta 6 muestras. Modelo Centromix de SELECTA.

Equipo de filtración a vacío

Compuesto por bomba de vacío GmbH de ILMVAC, matraz kitasatos, adaptador de vidrio y portafiltros de polipropileno. El mismo equipo se puede utilizar para filtración con crisoles de vidrio sinterizado.

3.3.1.4. Preparación de las muestras

La muestra problema de tensioactivo aniónico o no iónico y la muestra control del tensioactivo aniónico patrón se preparan de la siguiente forma: en un recipiente de vidrio de volumen adecuado y perfectamente limpio (apartado 3.6.) se procede a la mezcla de la disolución nutriente y el volumen necesario de disolución de tensioactivo a ensayar para obtener la concentración final deseada. A continuación se añaden 0.5 ml de inóculo por cada 1.2 L de mezcla a ensayar.

Antes de iniciar el ensayo, todo el volumen de muestra se somete a agitación durante 1 hora y aireación durante 15 minutos para homogeneizar el tensioactivo y evitar su acumulación en la interfase aire-agua, lo que podría determinar errores iniciales en la toma de muestra. Además inicialmente la disolución de ensayo no debe presentar espuma.

En todos los ensayos se prepara un blanco formado por la disolución nutriente y el inóculo, en cualquier caso exento de tensioactivo. También se somete a agitación durante 1 hora y aireación durante 15 minutos.

3.3.1.5. Procedimiento y condiciones de operación

Para ensayar la muestra problema y patrón, se introducen respectivamente 1.2 L en sendos matraces cónicos de 2 L de capacidad; cada matraz se tapa con algodón hidrófobo para no impedir la circulación de aire entre el interior del matraz y la atmósfera que lo rodea.

Los matraces se colocan en el agitador orbital (SELECTA Rotabit) a 125 carreras de vaivén por minuto. El continuo vaivén del agitador proporciona la agitación necesaria para mantener la disolución aireada. La capacidad del agitador es de 6 matraces, por lo que normalmente se coloca uno con la disolución patrón y 5 con la muestra problema para el estudio de la biodegradación. En caso de que se ensayen dos tensioactivos diferentes se coloca uno con la disolución patrón y dos para cada tensioactivo.

El sistema de agitación se dispone en una estancia oscura y termostatizada a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ equipada con resistencias eléctricas y refrigeración además de control de temperatura, las paredes se encuentran aisladas con poliuretano. La atmósfera ambiente debe mantenerse libre de contaminantes y productos tóxicos, especialmente de disolventes clorados. La cámara dispone de una lámpara de radiación ultravioleta que se conecta 1 hora antes del inicio del ensayo para esterilizar la misma.

En la estancia termostatizada se colocan 2 frascos Winkler perfectamente sellados con una sonda de oxígeno (CRISON OXI 96) cada uno para hacer el seguimiento de la biodegradabilidad a partir de medidas de oxígeno disuelto en la muestra problema y el blanco (apartado 3.4.1.6).

La frecuencia de muestreo vendrá determinada por el seguimiento del oxígeno disuelto que determina la biodegradación producida. Se toman muestras por duplicado y antes de proceder a la toma se agitan intensamente los matraces, durante 5 minutos, para romper la tendencia del tensioactivo a acumularse en la interfase agua-aire. La disolución de ensayo, ya libre de espuma, se homogeneiza para su posterior determinación.

Los volúmenes de muestra deben ser lo suficientemente grandes como para permitir el análisis de la biodegradación por el método analítico que corresponda. En cualquier caso las muestras se depositan en material de vidrio perfectamente limpio o en frascos de plástico asépticos.

Durante los ensayos de biodegradación se toman diferentes muestras para la determinación del número de unidades formadoras de colonias (UFC) y para la medida de la toxicidad durante el proceso de biodegradación.

Cuando la concentración de tensioactivo residual se mantiene constante con el tiempo se da por finalizado el ensayo de biodegradación.

En la Figura III. 1 se esquematiza el protocolo realizado y los métodos de análisis empleados para la toma de muestras tanto de la disolución de tensioactivo problema como para el tensioactivo control.

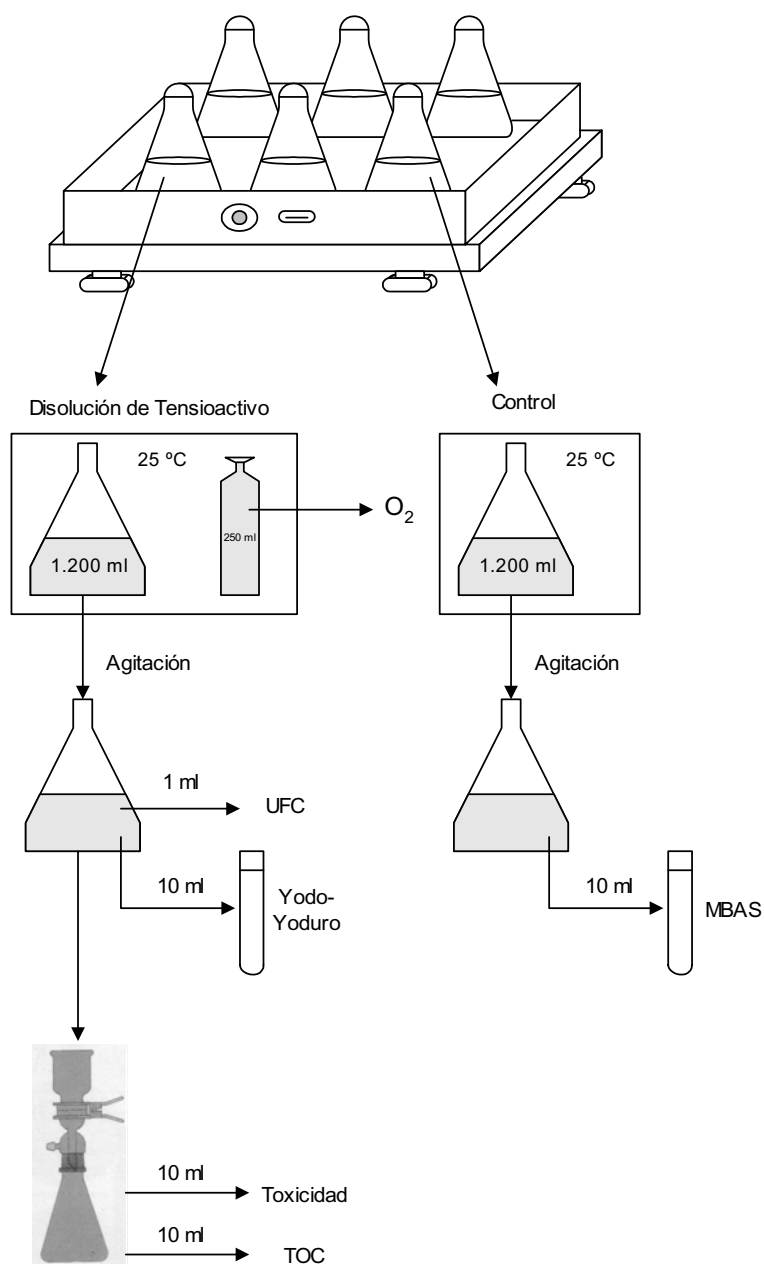


Figura III. 1.- Protocolo de muestreo para el ensayo estático de biodegradación

3.3.1.6. Seguimiento de la biodegradación

Para el tensioactivo problema se toman muestras durante los 19 días que como máximo dura el ensayo, siendo la primera de ellas la que sigue a la inoculación, a esta muestra se le denomina muestra a “tiempo cero”. La frecuencia de la toma de muestras depende del tensioactivo y de las medidas del oxígeno disuelto.

Para el tensioactivo aniónico utilizado como patrón se analiza la biodegradación el primer y quinto día del ensayo tras la inoculación, aunque también es posible seguir la biodegradación durante los 19 días.

El porcentaje de biodegradación se calcula por la fórmula:

$$A_i = \frac{(S_0 - S_i) \cdot 100}{S_0}$$

Ecuación III. 1

donde:

A_i : Porcentaje de biodegradación a tiempo t_i .

S_0 : Concentración media inicial de tensioactivo, expresada en mg/L.

S_i : Concentración de tensioactivo en la disolución de ensayo a tiempo t_i , expresada en mg/L.

Las determinaciones en el quinto día sirven para dar una indicación sobre si el inóculo empleado es efectivo. Para que los resultados del ensayo sean válidos, el patrón blando de tensioactivo aniónico debe biodegradarse hasta un valor comprendido entre 90 y 95% al cabo de 14 días de ensayo, si esto no sucede debe repetirse todo el ensayo (El experimento es rechazado y se propone otro en las mismas condiciones).

En cualquier caso se aceptan como válidos todos los ensayos en los que el % de biodegradación del patrón blando al cabo de 5 días es mayor del 90%.

3.3.2. ENSAYO DINÁMICO (ENSAYO DE COMPROBACIÓN)

Se utiliza este ensayo para determinar la biodegradabilidad de tensioactivos no iónicos. Viene recogido en la NORMA UNE 55-844-91 (UNE 55-844-91); “Determinación de la biodegradabilidad de agentes tensioactivos no iónicos empleados en la fabricación de formulaciones detergentes”.

El método especificado en esta norma y sus anexos se corresponde totalmente con el método para tensioactivos aniónicos y no iónicos que se detalla en el anexo I de la Orden del Ministerio de Industria y Energía del 5 de Septiembre de 1985 sobre “Actualización de la determinación de la biodegradabilidad de agentes tensioactivos utilizados en la preparación de los detergentes”, (BOE, 1985).

Por otra parte, éste método es el aprobado por la OCDE, (OECD, 1976). Las Directivas 82/242/CEE y 82/243/CEE del Consejo de las Comunidades Europeas, reconocen como válido el citado método de la OCDE para determinar el índice de biodegradabilidad de los tensioactivos aniónicos y no iónicos contenidos en los detergentes (CEE, 1982a; 1982b).

Se realiza este ensayo para los tensioactivos que no se biodegradan de forma satisfactoria durante el ensayo estático (de selección), se comprueba así su biodegradabilidad en condiciones próximas a las reales.

3.3.2.1. Fundamento del método

Consiste en inocular una pequeña cantidad de microorganismos, procedentes del efluente secundario de una planta de depuración que trabaja preferentemente con aguas residuales domésticas, en un agua residual sintética que contiene el tensioactivo cuya biodegradabilidad ha de determinarse.

El proceso de biodegradación se realiza en una pequeña planta de depuración (Figura III. 2), a escala de laboratorio, para tratamiento con fangos activos, en la cual se introduce el agua residual sintética con un caudal de 1 L por hora. El ensayo se efectúa a temperatura ambiente, la cual se mantiene estable entre 18 y 25°C.

El porcentaje de biodegradación primaria de los tensioactivos ensayados se determina diariamente a partir de las concentraciones de tensioactivo en el agua residual sintética que entra en la planta y en el efluente acumulado en el depósito de recogida durante las últimas 24 horas.

3.3.2.2. Reactivos y disoluciones

□ Agua residual sintética

Se prepara disolviendo en 1 L de agua corriente los productos especificados en la Tabla III. 9:

Tabla III. 9.- Reactivos para la preparación del agua residual sintética

Peptona bacteriológica de Panreac	160 mg
Extracto de carne de Panreac	110 mg
Urea, P.A. de Merck	30 mg
Cloruro sódico (NaCl, Q.P. de Panreac)	7 mg
Cloruro cálcico dihidratado (CaCl ₂ ·2H ₂ O, P.A. de Panreac)	4mg
Sulfato magnésico heptahidratado (MgSO ₄ ·7H ₂ O, P.R.S. de Panreac)	2 mg
Monohidrógenofosfato dipotásico (K ₂ HPO ₄ , P.A. de Panreac)	28 mg

□ Disolución de tensioactivo a ensayar

Se prepara una disolución de tensioactivo no iónico de 1g/L (disolución madre) disolviendo éste en agua desionizada. La disolución de concentración de tensioactivo requerida se obtiene por dilución de la disolución madre en agua desionizada hasta obtener la concentración de partida del ensayo, que será de 10 mg /L±1 mg/L.

Esta cantidad inicial de tensioactivo que se alimenta a la planta corresponde aproximadamente a las concentraciones detectadas en los sistemas de alimentación de las EDARs (Schöberl, 1991).

□ Inóculo

El inóculo debe proceder de un efluente secundario biológico de buena calidad, recién cogido de una planta de tratamiento de aguas residuales que opere predominantemente con vertidos de origen doméstico. Durante el tiempo que transcurre entre la toma del efluente y su utilización, éste debe mantenerse en condiciones aerobias.

3.3.2.3. Equipos

Equipo para el ensayo dinámico de biodegradabilidad

Está formado por una planta de depuración a escala de laboratorio a base de fangos activos. Su esquema simplificado se representa en la Figura III. 2.

Se utilizó un equipo, de dimensiones normalizadas según la NORMA UNE 55-844-91 (UNE 55-844-91), proporcionado por AFORA.

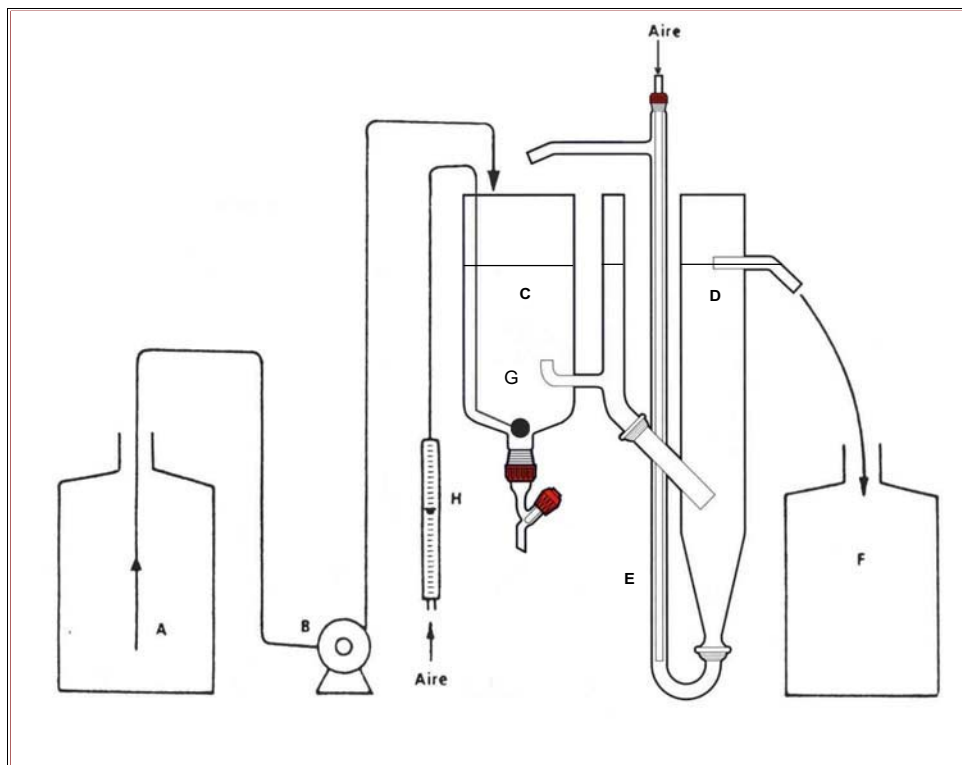


Figura III. 2.- Equipo utilizado en el Ensayo Dinámico de Biodegradación

El equipo consta de:

- A. Recipiente de almacenamiento, de vidrio o de un plástico adecuado, con 24 L de capacidad mínima para almacenar el agua residual sintética.
- B. Bomba dosificadora, que debe dar un caudal constante del agua residual sintética contenida en el recipiente A.
- C. Recipiente de aireación, que contiene unos 3 L de la suspensión del lodo activo en agua residual sintética durante una operación normal de biodegradación.
- D. Decantador, de 1.5 L de capacidad.
- E. Tubo de inyección de aire comprimido, para recircular el lodo activo decantado hacia el recipiente de aireación C.
- F. Colector de vidrio o de un plástico adecuado, con 24 L de capacidad mínima para recoger el efluente tratado.
- G. Aireador, formado por un disco de vidrio sinterizado, destinado a distribuir el aire en la suspensión que contiene el recipiente C. El aireador se sitúa en el fondo de este recipiente.
- H. Medidor de caudal de aire que, procedente de una bomba, se inyecta a través del aireador C.

Equipo para extracción y concentración en corriente gaseosa

Cuando la concentración de tensioactivo es pequeña o cuando es necesario extraer un producto tensioactivo de una solución para su valoración, ha de concentrarse, para lo que se utiliza este equipo que viene recogido en la norma UNE 55-725-87 (UNE 55-725-87): “Determinación de pequeñas concentraciones de tensioactivos no iónicos en medios acuosos usando el reactivo de Dragendorff”. Su esquema viene representado por la Figura III. 3. Se utilizó un equipo de dimensiones normalizadas proporcionado por AFORA.

Consta de un frasco lavador de vidrio de 100 ml que se llena de acetato de etilo ($\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$, P.A. de Panreac) hasta sus dos terceras partes, una columna con una placa filtrante de vidrio sinterizado que permite distribuir el aire uniformemente a través de la misma y un medidor de caudal del aire que circula por la columna. El frasco lavador y la columna están unidos por una junta esférica. El equipo se conecta a una salida de aire comprimido proporcionado por un compresor.

El aparato de extracción se coloca en una vitrina bien ventilada a fin de eliminar los vapores de acetato de etilo.

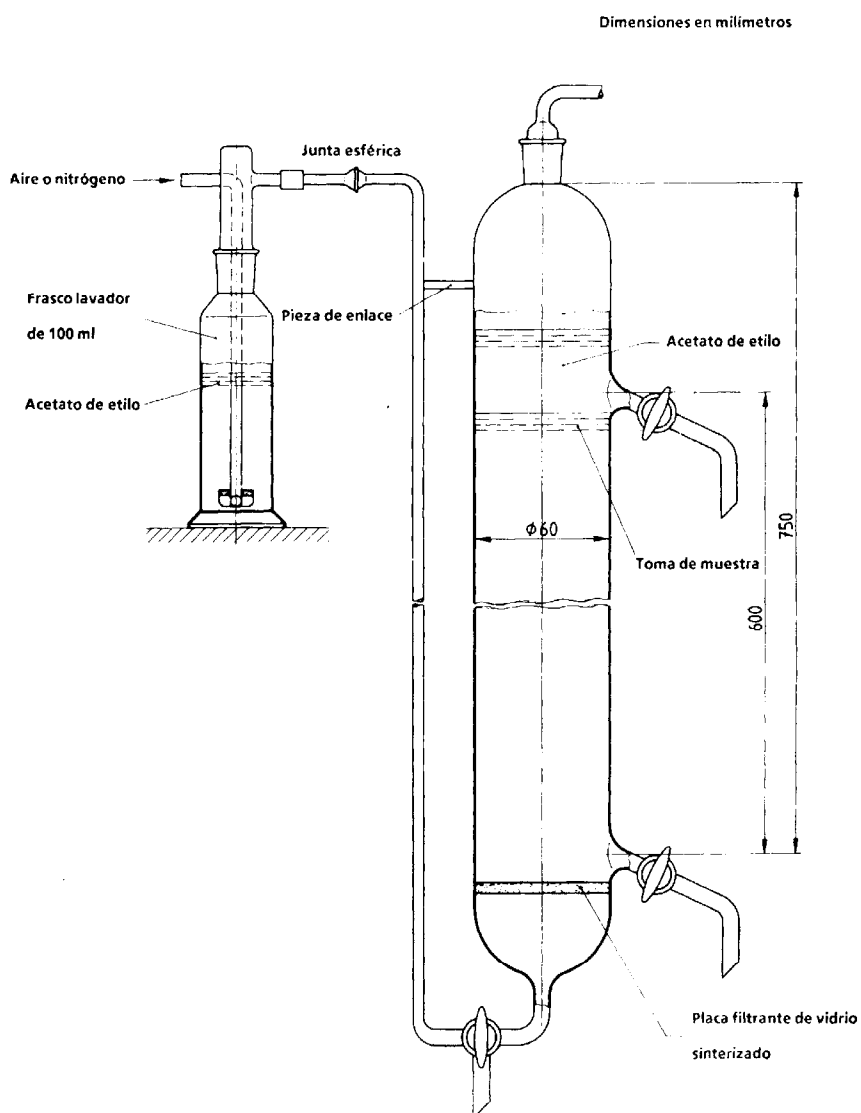


Figura III. 3.- Equipo para extracción y concentración en corriente gaseosa

Equipo de destilación

Montaje utilizado para la destilación de acetato de etilo con objeto de su purificación, compuesto por manta eléctrica de SELECTA para calentar un matraz de 2 L de capacidad y refrigerante encamisado, ambos de POBEL.

3.3.2.4. Puesta en marcha de la instalación

Para la puesta en marcha de la instalación se inocula el agua de alimentación con agua residual procedente del clarificador secundario de la estación depuradora de aguas residuales urbanas “Los Vados” de Granada (EDAR “Los Vados”) a razón de 200 ml por litro de agua residual sintética.

Una vez que el recipiente de almacenamiento contiene el agua residual sintética inoculada, por medio de la bomba dosificadora, se llena el recipiente de aireación y el decantador. La altura del decantador debe ser la necesaria para que el volumen de agua contenido en el recipiente de aireación sea de 3 L.

Se ponen en funcionamiento la entrada de aire a través del difusor cerámico (disco aireador) y al tubo de inyección mediante los compresores de aire. El caudal de recirculación debe ser del 100 % (medido respecto del de alimentación). El agua residual sintética debe circular en el interior del recipiente de aireación con un caudal de 1 L/h, lo que equivale a trabajar con un tiempo medio de residencia de 3 horas.

El compresor de aire conectado al difusor cerámico proporciona, por un lado, la cantidad de aire necesario para mantener la concentración de oxígeno disuelto por encima de los 2 mg/L., y por otro, la energía mecánica necesaria para mantener los fangos activados en suspensión y mezclados de forma homogénea.

La instalación se mantiene funcionando hasta que se alcanza una concentración de fango en el reactor de 3 ± 0.5 g/L, llegado este punto se extrae diariamente la cantidad necesaria para mantener la concentración de fango en el valor deseado. En estas condiciones, el valor de carga másica (CM) es de 0.53 calculada según:

$$CM = \frac{Kg\ DBO_5\ e\ eliminada}{Kg\ Sólidos\ en\ suspensión\ en\ el\ reactor}$$

Ecuación III. 2

La duración del período inicial de adaptación no debe ser superior a seis semanas.

Una vez alcanzadas las condiciones de operación del reactor, se incorpora al agua de alimentación el tensioactivo cuya biodegradabilidad se quiere medir, a una concentración de $10 \text{ mg/L} \pm 1 \text{ mg/L}$.

3.3.2.5. Procedimiento y condiciones de operación

El recipiente de almacenamiento debe contener, durante todo el ensayo, un volumen de agua residual sintética suficiente para asegurar la alimentación regular al recipiente de aireación y con un caudal de 1 L/h.

En el recipiente de aireación, ésta se regula de forma que los sólidos allí contenidos se mantengan constantemente en suspensión. El contenido en oxígeno disuelto del medio acuoso debe ser de 2 mg/L como mínimo. La temperatura del ensayo debe mantenerse, de una forma estable entre 18°C y 25°C.

El extremo inferior del tubo de inyección de aire comprimido debe situarse de forma que el lodo activo se recicle continua y regularmente desde el decantador hasta el recipiente de aireación. El lodo que se acumule en la parte superior del recipiente de aireación, en el fondo del decantador, o en otro lugar del circuito de desplazamiento del mismo, debe pasarse a la suspensión, al menos una vez al día, por medio de un escobillón u otro utensilio adecuado.

La formación de espuma debe evitarse en lo posible por medios adecuados, en cualquier caso no se utilizan antiespumantes que inhiban el fango activo o que contengan productos capaces de comportarse como tensioactivos.

El efluente del decantador se va recogiendo en el depósito colector. Cada 24 horas se mezcla bien su contenido, se toma un volumen del mismo que sea suficiente para determinar, por duplicado, la concentración de tensioactivo, se elimina el resto del efluente y se limpia cuidadosamente el colector con agua y sin utilizar ningún agente tensioactivo antes de iniciar una nueva recogida de efluente.

En la Figura III. 4 se muestra un esquema simplificado del protocolo de muestreo efectuado y las determinaciones necesarias para seguir la biodegradación del tensioactivo. Los tensioactivos no iónicos se analizan por el método colorimétrico del yodo-yoduro (apartado 3.4.1.3.) o mediante el método de Wickbold (apartado 3.4.1.2).

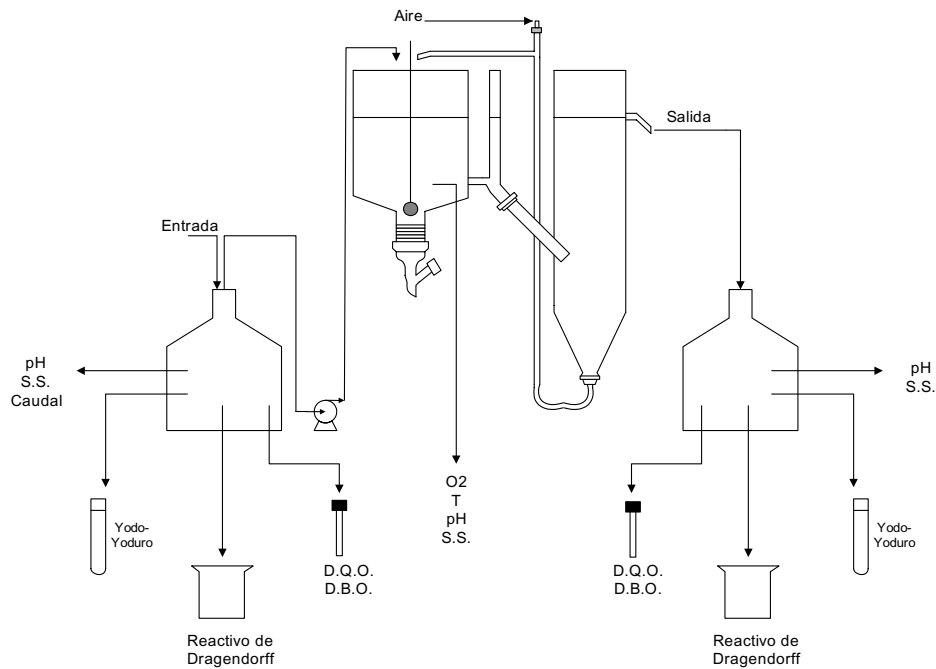


Figura III. 4.- Protocolo de muestreo para el ensayo dinámico de biodegradación

La comprobación de la eficacia del proceso se realiza determinando, al menos dos veces por semana, la diferencia entre los valores de la DQO, o entre los valores del COD, correspondientes al agua residual sintética inicial y al filtrado del efluente contenido en el colector.

La reducción en la DQO, o en el COD, debe igualarse cuando se obtenga un grado de biodegradación regular diario, es decir, una vez terminado el período inicial de biodegradación.

La materia seca en el lodo activo contenido en el recipiente de aireación debe determinarse, en gramos por litro, dos veces por semana. Si hay más de 3 g/L, el exceso de lodo activo debe retirarse purgando en el decantador la cantidad de fango que sea necesario.

3.3.2.6. Seguimiento de la biodegradación

La determinación de la concentración de tensioactivo en la muestra del efluente debe efectuarse inmediatamente. En caso contrario, la muestra debe mantenerse libre de alteraciones en su composición, preferentemente por congelación.

El método de análisis empleado para la determinación de la concentración de tensioactivo ha sido el método de Wickbold con el reactivo de Dragendorff (apartado 3.4.1.2.).

El porcentaje de biodegradación se calcula cada día, aplicando la fórmula;

$$A_t = \frac{(S_a - S_e) \cdot 100}{S_a}$$

Ecuación III. 3

donde:

A_t : Porcentaje de biodegradación en el día “t”.

S_a : Concentración de tensioactivo, expresada en mg/L, en el agua residual sintética que entra en el recipiente de aireación.

S_e : Concentración de tensioactivo, expresada en mg/L, en el efluente acumulado durante las últimas 24 horas en el depósito colector.

Los valores de A_t se calculan con precisión de ± 0.1 y el resultado final se expresa como porcentaje sin decimales.

En algunos casos puede permitirse una reducción de la frecuencia de muestreo; pero, para calcular la media, deben recogerse como mínimo 14 resultados correspondientes al período de los 21 días siguientes al final del período inicial de adaptación.

Los porcentajes de biodegradación obtenidos se representan gráficamente de la forma indicada en la Figura III. 5 donde se observan los resultados que pueden obtenerse en función del tiempo, dependiendo de la biodegradabilidad del tensioactivo ensayado.

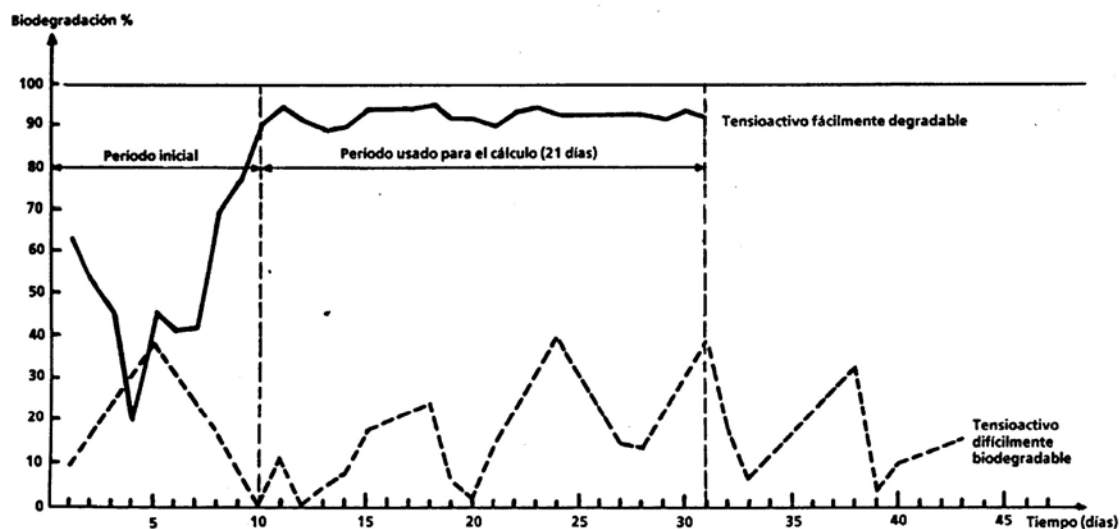


Figura III. 5.- Perfil típico de biodegradación para el ensayo dinámico de biodegradación

La biodegradabilidad del tensioactivo viene expresada por la media aritmética de los valores de A_t correspondientes a los 21 días que siguen al período inicial de adaptación, siempre que la biodegradación haya sido regular y que el funcionamiento del equipo no haya presentado problemas.

3.3.3. ENSAYO POR EL MÉTODO RESPIROMÉTRICO

La biodegradación es principalmente un proceso oxidativo. La cantidad teórica de oxígeno requerido para la oxidación completa del compuesto es la misma independientemente del mecanismo: químico o bioquímico. En principio la biodegradabilidad última de un tensioactivo se puede medir como DBO. En la práctica la interpretación de los resultados es dificultosa debido a la extrema complejidad de los procesos metabólicos implicados, ya que el oxígeno es utilizado por los microorganismos para una multitud de reacciones, no únicamente para la oxidación del compuesto.

3.3.3.1. Fundamento del método

Los microorganismos existentes en un compartimento ambiental que contiene materia orgánica biodegradable, utilizan oxígeno para sus procesos bioquímicos y producen un volumen equivalente de CO₂.

Si dichos procesos se desarrollan en un sistema cerrado y el CO₂ es absorbido por un álcali fuerte, por ejemplo hidróxido potásico, es posible medir la DBO a partir de una progresiva disminución de la presión interna en el sistema.

3.3.3.2. Reactivos y disoluciones

- *Hidróxido potásico* (KOH, P.R.S. de Panreac), aunque no se requiere el reactivo particularmente puro. Se utiliza para la absorción del CO₂.

La disolución nutriente y la disolución de tensioactivo a ensayar se preparan de igual forma que para el ensayo estático (apartado 3.3.1.2.).

3.3.3.3. Equipos

El equipo utilizado para medir la DBO por técnica respirométrica fue el proporcionado por *VELP Scientifica*, modelo BOD Sensor System 6, y que consta de una unidad de agitación con capacidad para seis botellas de DBO.

Cada botella (fabricada en vidrio) tiene una capacidad nominal de 500 ml, va provista de un alojamiento para reactivos o reservorio de absorción de CO₂, así como de un sensor que es enroscado directamente en la botella de DBO. Este sensor posee un transductor interno de presión que traduce los valores de presión directamente en valores de DBO mediante un microprocesador (Figura III. 6).

El equipo permite medir valores de DBO en el rango 90-1000 mg O₂/L, en función del valor de DBO esperado el equipo permite elegir una escala de medida que condiciona el volumen de muestra a ensayar (Tabla III. 10).

Tabla III. 10.- Volúmenes de muestra y valores de DBO en función de la escala elgida en el equipo respirométrico

Escala	Volumen de muestra, ml
A: 0-1000 mg O ₂ /L	0
B: 0-600 mg O ₂ /L	150
C: 0-250 mg O ₂ /L	250
D: 0-90 mg O ₂ /L	400

El equipo agitador con las seis botellas se aloja en una estufa termostatzada para mantener la temperatura constante a 25°C durante todo el ensayo, las botellas se incuban en ausencia de luz para evitar las interferencias debidas a la producción de oxígeno fotosintético de algas.

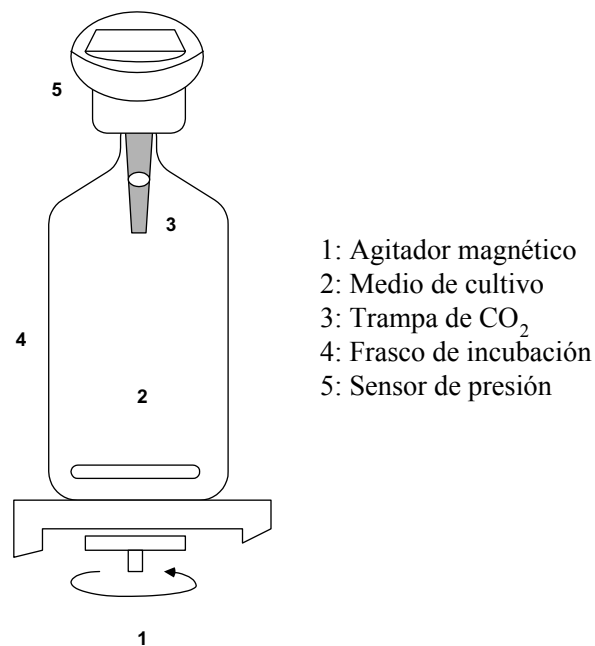


Figura III. 6.- Representación esquemática del equipo respirométrico

3.3.3.4. Procedimiento

Consiste en inocular una pequeña cantidad de microorganismos aerobios, procedentes de una población mixta y aireada, en una mezcla formada por la disolución nutriente, y la disolución de ensayo que contiene los tensioactivos a la concentración requerida (entre 0-100 mg/L). El inóculo utilizado se tomó del efluente secundario de una

planta de depuración mediante fangos activos que opera con vertidos urbanos (EDAR “Los Vados”). La cantidad de inóculo empleada fué de 0.5 ml por 1200 ml de disolución nutriente (apartado 3.3.1.2.).

Para ensayar la muestra problema, se introducen 400 ml de la disolución anterior en cada una de las botellas de DBO. Una vez que se ha introducido el hidróxido potásico en el recipiente reservorio para la absorción de CO₂ se cierran las botellas herméticamente al enroscar el sensor en la botella. Las botellas se colocan en el agitador que tiene una capacidad de 6 puestos, por lo que normalmente se coloca una botella con el blanco y 5 con la muestra problema para el estudio de la biodegradabilidad final.

El sistema de agitación se dispone en una estufa termostatzada a 25° C ± 1° C equipada con control de temperatura y en ausencia de luz.

3.3.3.5. Toma de datos y expresión de los resultados

El equipo de DBO permite registrar la disminución de la presión interna de forma continua en el sensor de presión, y la DBO es calculada de acuerdo con la siguiente expresión (Reuschenbach, 2003):

$$DBO = \frac{M(O_2)}{R \cdot T} \cdot \left(\frac{V_{TOTAL} - V_{LIQUIDO}}{V_{TOTAL}} + \alpha \cdot \frac{T_{25}}{T_0} \right) \cdot \Delta p(O_2)$$

Ecuación III. 4

donde:

M(O₂): peso molecular del oxígeno.

R: constante de los gases.

T₀: temperatura a 0°C.

T₂₅: temperatura de incubación (25 °C).

V_{TOTAL}: volumen de la botella.

V_{LIQUIDO}: volumen de líquido contenido en la botella.

α: coeficiente de absorción de Bunsen.

Δp : diferencia de la presión parcial de oxígeno.

El equipo de DBO almacena y registra los valores de DBO cada 24 horas, sin embargo la toma de datos se efectuó de forma regular durante todo el período de duración del ensayo leyendo el valor de DBO en la pantalla del sensor.

Una vez que se han restado los valores de DBO del blanco a los valores de DBO de la muestra, la biodegradación se calcula mediante la DBO y la demanda teórica de oxígeno (DO_T).

En la Figura III. 7 se muestra, a título de ejemplo, una curva de DBO obtenida por técnica respirométrica.

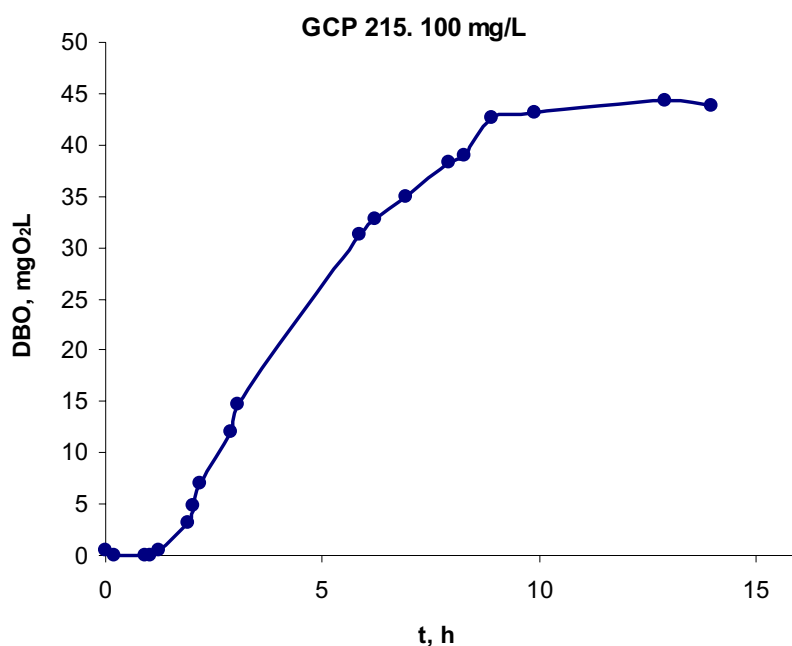


Figura III. 7.- Curva de DBO obtenida por técnica respirométrica para el tensioactivo GCP 215 a 100 mg/L

3.3.4. ENSAYO POR EL MÉTODO DE LA BOTELLA CERRADA

3.3.4.1. Fundamento del método

Es posible evaluar la biodegradabilidad final en sistemas aerobios mediante determinaciones de tipo no específico (como el oxígeno disuelto, la demanda química de oxígeno, la demanda biológica de oxígeno, el carbono orgánico total, etc), con lo que se obtiene información sobre la biodegradabilidad total del tensioactivo ensayado.

3.3.4.2. Reactivos y disoluciones

La disolución nutriente y la disolución de tensioactivo a ensayar se preparan de igual forma que para el ensayo estático (apartado 3.3.1.2.).

3.3.4.3. Equipos

Se utilizan frascos Winkler de 250 ml de capacidad provistos de un agitador magnético para la agitación de la disolución y una sonda de oxígeno (CRISON OXI 96) para la medida del oxígeno disuelto.

3.3.4.4. Procedimiento

Se inocula una pequeña cantidad de microorganismos aerobios, procedentes de una población mixta y aireada, en una mezcla formada por la disolución nutriente, y la disolución de ensayo que contiene los tensioactivos a la concentración requerida. El inóculo utilizado se tomó del efluente secundario de una planta de depuración mediante fangos activos que opera con vertidos urbanos (EDAR “Los Vados”). La cantidad de inóculo empleada fué de 0.5 ml por 1200 ml de disolución nutriente (apartado 3.3.1.2.).

La concentración de sustancia de ensayo a emplear no debe de exceder los 10 mg/L. El ensayo en el que se mide el oxígeno disuelto está limitado porque obliga a trabajar con concentraciones de tensioactivo muy pequeñas.

La disolución que se desee analizar se coloca en un frasco Winkler de 250 ml de capacidad. De igual forma se prepara otro frasco Winkler con la disolución nutriente y exento de tensioactivo. Los frascos se cierran herméticamente, teniendo cuidado de excluir las burbujas de aire, se pone en marcha el agitador magnético y la sonda lee el contenido de oxígeno disuelto en mg O₂/L. Los frascos Winkler se disponen en una cámara termostatzada que permite mantener la temperatura en 25 °C y en ausencia de luz.

3.3.4.5. Toma de datos y expresión de los resultados

De forma periódica se anotan los valores de oxígeno disuelto en mgO₂/L en función del tiempo.

3.4. MÉTODOS DE ANÁLISIS

3.4.1. ANÁLISIS DE TENSIOACTIVOS

3.4.1.1. Método de análisis simplificado para determinación de sustancias activas al azul de metileno (MBAS)

Para la medida de la concentración de tensioactivos aniónicos se ha ensayado y puesto a punto una simplificación del método que se describe en NORMA UNE EN 903 (UNE EN 903); “Determinación de agentes aniónicos de superficie por medición del índice de azul de metileno SAAM”.

Fundamento del método

Se basa en la formación de sales coloreadas del tensioactivo aniónico, en medio alcalino, con azul de metileno. Estas sales se extraen con cloroformo y se hace un tratamiento ácido de la disolución clorofórmica. Se eliminan las interferencias por extracción del complejo “sustancia aniónica-azul de metileno” contenido en la disolución alcalina, posteriormente se agita el extracto en presencia de una disolución ácida de azul de metileno y se mide espectrofotométricamente la absorbancia de la fase orgánica.

Reactivos y Disoluciones

- *Cloroformo* (CHCl_3 , P.A. de Panreac).
- *Disolución de azul de metileno*, estabilizada a pH ligeramente ácido; se disuelven 0.1 g de azul de metileno ($\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{ClN}_3\text{S}\cdot x\text{H}_2\text{O}$, P.A. de Panreac) en 100 ml de la disolución tampón bórax 10 mM y pH 5-6. Esta disolución se guarda en un frasco color topacio.
- *Disolución madre patrón de dodecilbenceno sulfonato sódico*; se prepara a 1 g/L y pH neutro.
- *Disolución patrón de dodecilbenceno sulfonato sódico de 10 mg/L*; preparada por dilución 1/100 de la disolución madre patrón.
- *Solución tampón de tetraborato sódico* ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, P.A. de Panreac) 50 mM y pH 10.5.

Procedimiento

En viales de vidrio para medidas espectrofotométricas de 10 ml de capacidad, se adicionan 5 ml de muestra, y se alcaliniza hasta pH 10 mediante la adición de 200 μ l de tetraborato sódico 50mM y pH 10.5, a continuación se añaden 100 μ l de azul de metileno de 1 g/L estabilizado. Finalmente se adicionan 4 ml de cloroformo, y tras agitar, se esperan 5 minutos antes de medir la absorbancia a 650 nm frente a aire o frente a un blanco con cloroformo.

A título de ejemplo se muestra una recta de calibrado para el tensioactivo aniónico LAS.

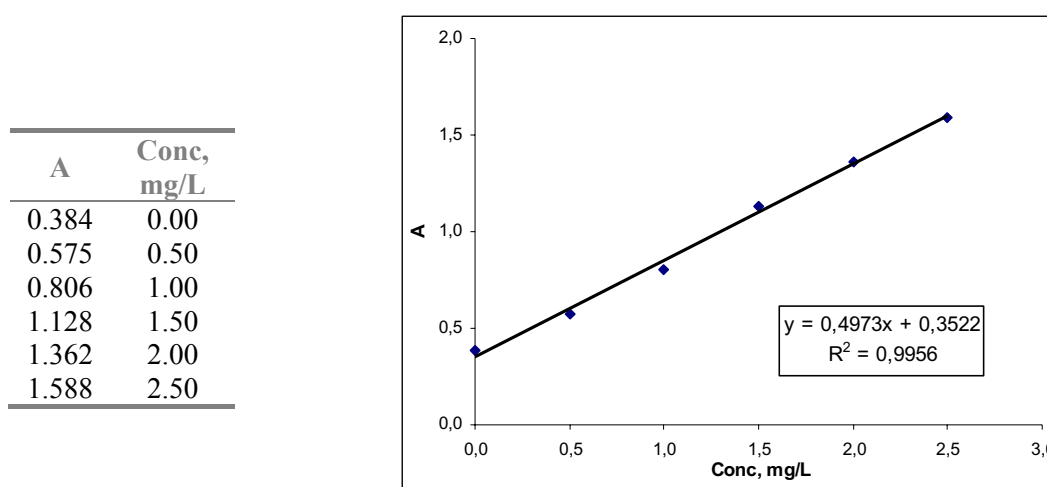


Figura III. 8.- Recta de calibrado para el método de análisis simplificado para la determinación de sustancias activas al azul de metileno

3.4.1.2. Método de Wickbold con el Reactivo de Dragendorff

El método de Wickbold está descrito en la NORMA UNE 55-725-87 (UNE 55-725-87): “Determinación de pequeñas concentraciones de tensioactivos no iónicos en medios acuosos usando el reactivo de Dragendorff”. Esta norma se corresponde totalmente con la Norma Internacional ISO 7875/2-1984.

La norma es aplicable a la determinación de pequeñas concentraciones de sustancias activas frente al bismuto (BiAS), es decir, de los tensioactivos no iónicos obtenidos por etoxilación de alquilfenoles o de alcoholes en la medida en que ellos pueden

purificarse y precipitarse con el reactivo de Dragendorff (por ejemplo, los etoxilados con 5 a 30 moles de óxido de etileno por molécula).

El límite de detección del método es de 0.05 mg/L para una muestra de 1L y la gama óptima de aplicación es de 0.25 a 0.8 mg/L.

Fundamento del método

Consiste en la extracción del tensioactivo contenido en la muestra de ensayo por medio de una corriente de aire (Figura III. 3), el tensioactivo se recoge en acetato de etilo, después se elimina el acetato de etilo y se precipita el tensioactivo no iónico con el reactivo de Dragendorff ($\text{KBiI}_4 + \text{BaCl}_2 + \text{CH}_3\text{COOH}$).

Se separa el precipitado, se disuelve y se determina la concentración de bismuto, equivalente a la concentración de tensioactivo, por potenciometría con una disolución de pirrolidinil-1 ditiocarboxilato de sodio o por espectrometría ultravioleta.

Reactivos y Disoluciones

- *Hidrogenocarbonato sódico* (NaHCO_3 , P.A. de Panreac).
- *Acetato de etilo* ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$, P.A. de Panreac), recién destilado.
- *Metanol*, (CH_3OH , P.A.I. de Panreac).
- *Ácido acético glacial* (CH_3COOH , Q.P. de Panreac), de densidad 1.05 g/ml.
- *Ácido clorhídrico* (HCl 37%, P.A. de Panreac).
- *Ácido sulfúrico* (H_2SO_4 96%, P.A. de Panreac). $c = 0.5$ mol/L.
- *Ácido etilen-diamino-tetraacético* (EDTA $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, P.A. de Scharlau).
- *Disolución de amoníaco*, 10 ml de amoníaco (NH_3 , P.A. de Panreac) de densidad 0.91 g/ml en 250 ml de agua.
- *Disolución de tartrato amónico*, se añaden 12.40 g de ácido tartárico ($\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_6$, P.A. de Panreac) a 12.40 g de amoníaco de densidad 0.91 g/ml y se diluye a 1000 ml con agua.
- *Reactivo de precipitación* (Reactivo de Dragendorff);
 - Se mezclan dos volúmenes de la disolución A y un volumen de la disolución B.
 - Disolución A: Se disuelven 1.70 g de nitrato básico de bismuto (III) monohidratado ($\text{BiONO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, P.A. de Panreac) en 20 ml de ácido acético glacial y se diluye a 100 ml con agua. Se disuelven 65 g de

yoduro potásico (KI, P.A. de Panreac) en unos 200 ml de agua. Se mezclan las dos disoluciones en un matraz aforado de 1000 ml, se añaden 200 ml de ácido acético glacial y se completa el volumen con agua. Esta disolución, conservada fuera de la luz, se mantiene estable durante una semana aproximadamente.

- Disolución B: Se Disuelven 290 g de cloruro bórico dihidratado ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, P.A. de Panreac) en 1000 ml de agua. Ésta disolución, conservada en frasco de vidrio oscuro, permanece estable durante una semana aproximadamente.
- *Disolución tampón de acetato*: Se disuelven 40 g de hidróxido sódico (NaOH, P.A. de Merck) en unos 500 ml de agua. Se añaden 120 ml de ácido acético glacial. Se mezcla cuidadosamente, se deja enfriar y se diluye a 1000 ml con agua en un matraz aforado.
- *Pirrolidinil-1 ditioacrilato sódico*, disolución a 0.5 mmol/L: Se disuelven 103 mg de Pirrolidinil-1 ditioacrilato sódico dihidratado ($\text{C}_5\text{H}_8\text{NS}_2\text{Na} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, P.A. de Fluka) en unos 500 ml de agua, se añaden 10 ml de alcohol amílico ($\text{C}_5\text{H}_{11}\text{OH}$, P.R.S. de Panreac) y 0.5 g de hidrógenocarbonato sódico y se diluye a 1000 ml con agua.
- *Disolución madre patrón de sulfato de cobre (II)*: Se disuelven 1.249 g de sulfato de cobre (II) pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, P.R.S. de Panreac) en 50 ml de ácido sulfúrico y 200 ml de agua. Luego se diluye a 1000 ml con agua. No se deben utilizar cristales rotos ni eflorescentes.
- *Disolución patrón de sulfato de cobre (II)*: Se añaden 50 ml de la disolución madre patrón de sulfato de cobre a 10 ml de la disolución de ácido sulfúrico y se diluye a 1000 ml con agua.
- *Disolución metanólica de púrpura de bromocresol*: Se disuelven 0.10 g de púrpura de bromocresol ($\text{C}_{21}\text{H}_{16}\text{Br}_2\text{O}_5\text{S}$, P.A. de Panreac) en 100 ml de metanol.

Procedimiento

❖ Concentración y separación del tensioactivo

Las muestras, recogidas en frascos de vidrio perfectamente limpios, deben estar exentas de materia en suspensión (menos de 0.3 g/L), por lo que se centrifugan las mismas si es necesario antes de comenzar el análisis.

La toma de ensayo, formada por un volumen definido de muestra, se introduce en el aparato de extracción en corriente gaseosa. Si el volumen de muestra sobrepasa los 500 ml se añaden 100 g de cloruro sódico y 5 de hidrógenocarbonato sódico en forma sólida, y se disuelven las sales haciendo pasar una corriente de aire por la toma de ensayo. Si el volumen de muestra es inferior a 500 ml, se disuelven las sales anteriores en 400 ml de agua y se añaden a la toma de ensayo, completándose el resto de la columna de extracción con agua hasta el nivel de la llave superior de la misma.

Una vez llena la columna se añaden 100 ml de acetato de etilo. Se llena el frasco lavador, por el que circula la corriente de aire, hasta dos tercios con acetato de etilo. El caudal de aire debe tener un caudal comprendido entre 20 y 50 L/h, se regula de tal forma que la fase acuosa y la orgánica permanezcan separadas y no haya turbulencia en la interfase, de esta forma la mezcla de las fases y de la disolución de acetato de etilo con el agua está limitada.

Terminada la fase de extracción del tensioactivo se traslada toda la fase orgánica a un embudo de decantación, las trazas de agua que aparezcan en el embudo se devuelven a la columna de extracción. Se añaden otros 100 ml de acetato de etilo a la columna de extracción y se hace pasar de nuevo una corriente de aire durante 10 minutos. Se separa de nuevo la fase orgánica utilizando el mismo embudo de decantación y todo el acetato de etilo recogido se trasvasa a un matraz de fondo redondo. Para eliminar toda la disolución de acetato de etilo se utiliza un evaporador rotativo ROTAVAPOR R-110 de la casa BÜCHI situado dentro de una vitrina.

❖ Precipitación y filtración

El residuo seco que se obtiene se disuelve añadiendo 5 ml de metanol, 40 ml de agua y 0.5 ml de la disolución de ácido clorhídrico, se agita con un agitador magnético, y se añaden, con una probeta graduada 30 ml de reactivo de precipitación. Se agita continuamente el matraz durante la formación del precipitado, se detiene la agitación al cabo de 10 minutos y se espera durante 5 minutos como mínimo.

Se coloca un crisol filtrante de vidrio sinterizado de porosidad 4 y 40 ml de capacidad en un adaptador apropiado, fijado sobre un matraz para filtración de 500 ml. Se lava el vaso, el agitador y el crisol con pequeñas porciones de ácido acético glacial hasta un total de 50 ml.

❖ Disolución del precipitado

Se coloca el crisol anterior en un adaptador de vidrio montado sobre un matraz de filtración de 250 ml. Se disuelve el precipitado añadiendo cuidadosamente 50 ml de una disolución caliente de tartrato amónico a unos 80 °C (disolución que previamente se pasa por el matraz redondo para disolver el precipitado que quede), se lava cuidadosamente el crisol, el adaptador y el matraz de filtración con 100 ml de agua, finalmente se añade ésta agua de lavado a la disolución que resulta de la disolución. Todo se lleva a un vaso de vidrio perfectamente limpio.

A continuación se lleva a cabo el análisis por el método potenciométrico o espectrofotométrico:

❖ Método potenciométrico

En primer lugar se trata de valorar la disolución de pirrolidinil-1 ditiocarboxilato sódico; la concentración de la disolución de pirrolidinil-1 ditiocarboxilato sódico debe controlarse antes de cada empleo, o al menos una vez al día. Para ello se valora una mezcla de 10 ml de la disolución patrón de sulfato de cobre, 100 ml de agua y 10 ml de la disolución tampón de acetato.

El factor de corrección de la valoración “t” de la disolución de pirrolidinil-1 ditiocarboxilato sódico se calcula a partir de la expresión:

$$t = \frac{V_1}{V_2}$$

Ecuación III. 5

donde:

V₁: Volumen en ml de la disolución patrón. (V₁=10 ml).

V₂: Volumen en ml de la disolución de pirrolidinil-1 ditiocarboxilato sódico consumido.

El factor de corrección de la valoración tiene un valor inferior a la unidad.

A continuación se procede a la valoración de la muestra de ensayo:

A la disolución obtenida se añaden unas gotas de indicador de púrpura de bromocresol y de una disolución de amoníaco hasta que la disolución vire del anaranjado al violeta. Se añaden 10 ml de la disolución tampón de acetato, se sumergen los electrodos y se valora con la disolución de pirrolidinil-1 ditiocarboxilato sódico.

La valoración continúa hasta que haya una caída de potencial significativa. El caudal de la bureta se regula a 2ml/min. El punto final de la valoración se determina a partir de la intersección de las tangentes a las dos ramas de la curva de potencial. A veces, la inflexión de las curvas de potencial puede estar aplanada, lo que se puede evitar limpiando cuidadosamente el electrodo de platino.

En la Figura III. 9 se muestra, a título de ejemplo, una curva de valoración potenciométrica para el tensioactivo no iónico Findet 1214N/23.

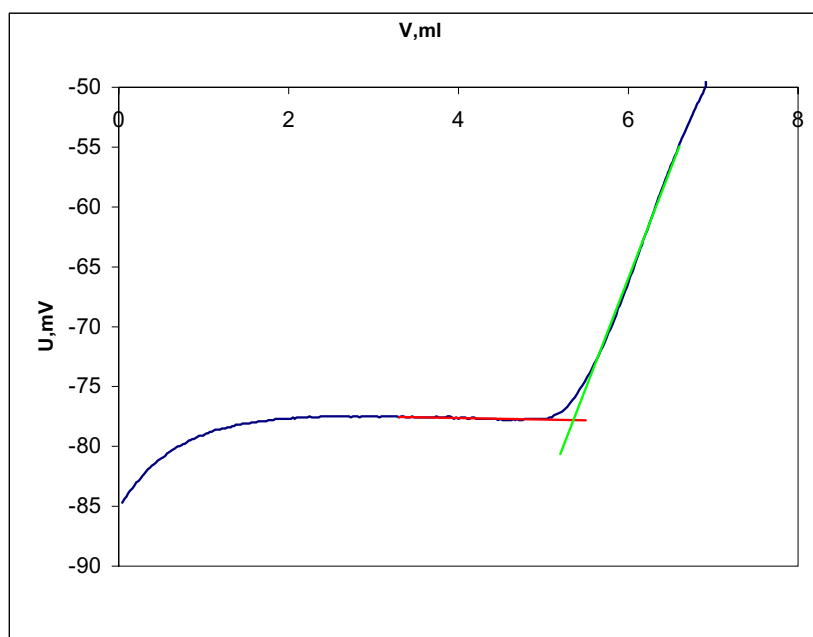


Figura III. 9.- Curva de valoración potenciométrica para el reactivo de Dragendorff

Ensayo en blanco

Para cada serie de muestras, se efectúa de forma paralela a la determinación, un ensayo en blanco utilizando 5 ml de metanol y 40 ml de agua, al que se le aplica el mismo procedimiento.

El consumo de la disolución de pirrolidinil-1 ditiocarboxilato sódico debe ser inferior a 1 ml. En otro caso debe controlarse el contenido en metales pesados de los reactivos.

Expresión de los resultados

A partir del volumen de pirrolidinil-1 ditiocarboxilato sódico se calcula la concentración de tensioactivo. Cada tensioactivo no iónico, en función de la longitud de la cadena de óxido de etileno, tiene su propio factor de conversión, por tanto los cálculos se refieren a una sustancia estándar. Un nonilfenol polietoxilado con 10 moles de óxido de etileno (NP 10) es apropiado como estándar. Para este tensioactivo se ha determinado un factor empírico de 54, que significa que 1 ml de la disolución de pirrolidinil-1 ditiocarboxilato sódico equivale a 54 μg de NP 10.

La concentración del tensioactivo no iónico, σ_x , expresada en miligramos de NP 10 por litro de muestra, se calcula por la ecuación;

$$\sigma_x = \frac{(v_3 - v_4) \cdot t \cdot f}{v_0}$$

Ecuación III. 6

V_0 ; volumen en ml de la toma de ensayo.

V_3 ; volumen en ml de la disolución de pirrolidinil-1 ditiocarboxilato sódico consumido por la toma de ensayo.

V_4 ; volumen en ml de la disolución de pirrolidinil-1 ditiocarboxilato sódico consumido por el ensayo en blanco.

t; factor de corrección de la concentración de la disolución de pirrolidinil-1 ditiocarboxilato sódico.

f; factor de cálculo, en este caso $f=54 \text{ mg/L}$.

Para la gama de concentraciones entre 0.5 y 1.0 mg/L, la desviación típica relativa es igual a $\pm 10\%$.

❖ Método por espectrometría ultravioleta

Se procede de igual forma que en el método potenciométrico para la precipitación, filtración y disolución del precipitado. Las aguas de lavado se trasvasan a un matraz aforado de 100 ml, perfectamente limpio, al que se añaden 4 ml de una disolución de ácido etilén diamino tetraacético (EDTA), el resto se completa con agua.

Se lee la absorbancia de la disolución del matraz aforado a una longitud de onda de 263.5 nm frente al aire o frente a agua. Se preparan disoluciones de calibrado que contengan 0; 200; 400, 600 y 1000 μg de tensioactivo no iónico estándar, por disolución de cantidades adecuadas en 5 ml de metanol y 40 ml de agua. Se calcula el peso de tensioactivo no iónico en la toma de muestra a partir de la curva de calibrado.

En la Figura III. 10 se muestra, a título de ejemplo, una recta de calibrado para el tensioactivo no iónico Findet 1214N/23.

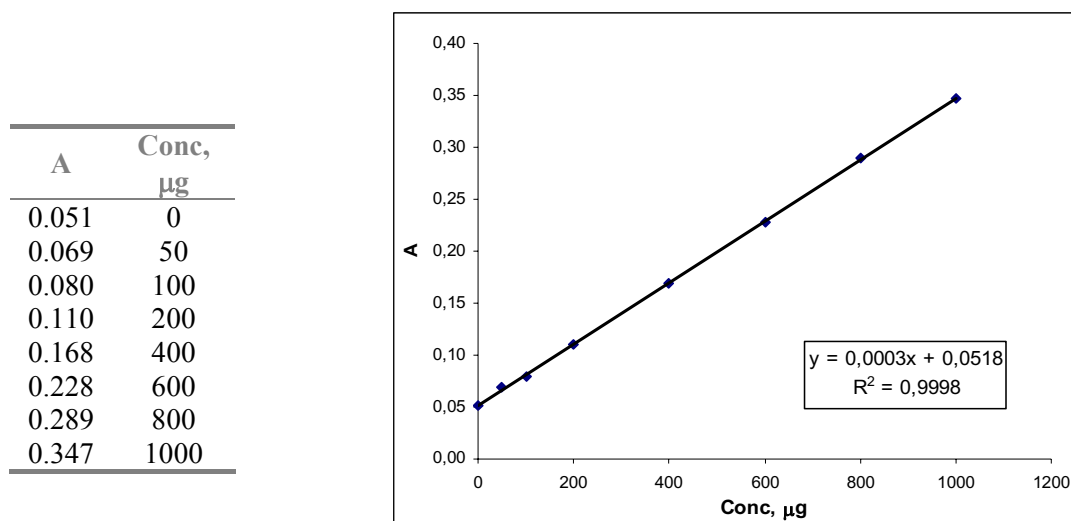


Figura III. 10.- Recta de calibrado por el método espectrofotométrico para el reactivo de Dragendorff

3.4.1.3. Método colorimétrico del yodo-yoduro

Se trata de un método semiespecífico para tensioactivos no iónicos, ya que dentro de esta clase de tensioactivos el método no distingue al tensioactivo concreto de que se trata.

Fundamento del método

Se basa en la formación de un complejo coloreado entre el tensioactivo no iónico y el reactivo yodo-yoduro. Este complejo coloreado se determina espectrofotométricamente. La absorbancia es directamente proporcional a la concentración de tensioactivo no iónico.

Reactivos y disoluciones

Durante todo el análisis se utilizan reactivos de calidad analítica reconocida, y agua destilada, o de pureza equivalente.

- *Reactivo yodo-yoduro*; se disuelve 1g de yodo (calidad Q.P. de Panreac) y 2g de yoduro potásico (KI, calidad P.A. de Panreac) en 100 ml de agua. Esta solución debe conservarse en frasco de vidrio color topacio y se renueva cada 8 días.
- *Solución madre patrón de tensioactivo no iónico de 1g/L.*
- *Solución hija patrón de tensioactivo no iónico de 0.020 g/L* preparada por dilución 1/50 de la solución madre patrón.

Procedimiento

Se añaden 0.25 ml de reactivo yodo-yoduro sobre 10 ml de la muestra problema, se agita y se mantiene durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se mide la absorbancia frente al aire a 500 nm en un espectrofotómetro.

La evaluación de los resultados se realiza por medio de una recta de calibrado, para cada una de las medidas de la muestra, que da directamente el contenido de tensioactivo no iónico expresado en mg/L. La curva de calibrado debe prepararse con el tensioactivo no iónico de que se trate en cada caso, puesto que es diferente para cada uno.

En la Figura III. 11 se muestra, a título de ejemplo, una recta de calibrado para el tensioactivo Findet 1214N/23.

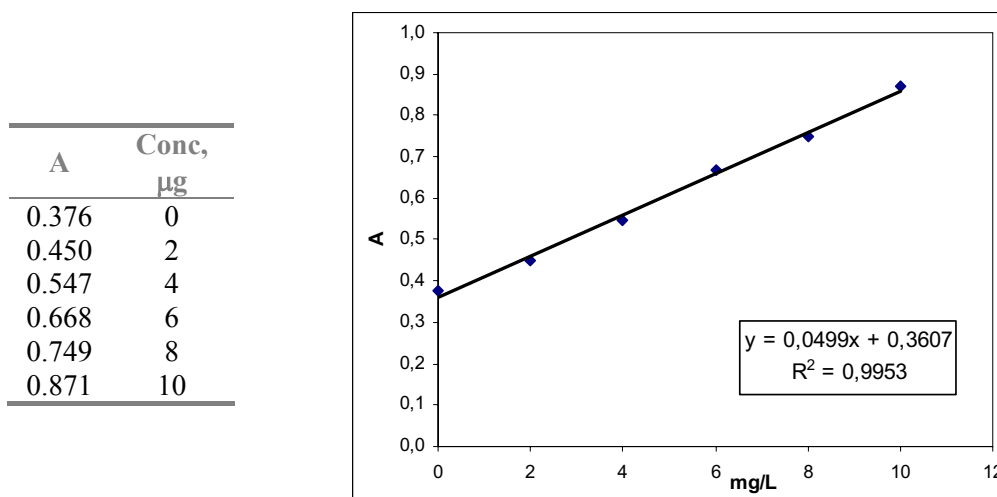


Figura III. 11.- Recta de calibrado por el método colorimétrico del yodo-yoduro

3.4.1.4. Método del carbono orgánico total (TOC)

Actualmente existen dos métodos para determinar el contenido de carbono orgánico total (TOC), denominados de “diferencia” y de “purgado”. El método elegido en este trabajo es el de purgado que determina el TOC directamente con una única medida, el carbono inorgánico total se elimina en la fase de preparación de la muestra. El hecho de que los resultados obtenidos con este método presenten desviaciones menores, puesto que el TOC es medido directamente, y que el manejo de la muestra sea más sencillo y rápido nos lleva a elegir el método de purgado.

Se utiliza el test de ensayo de TOC, Método de Purgado LCK 383, de Dr.LANGE.

Fundamento del método

El carbono orgánico total (TOC) se transforma en dióxido de carbono (CO_2) mediante oxidación. El CO_2 se detecta cuantitativamente en una determinación espectrofotométrica.

El carbono inorgánico total (TIC) se elimina previamente sometiendo la muestra a acidificación y agitación durante la fase de preparación. En la cubeta de ensayo se lleva a cabo una oxidación química en medio húmedo. El CO_2 de la cubeta de digestión pasa a través de una membrana gas-permeable a la cubeta indicadora. El cambio de color resultante del indicador se evalúa espectrofotométricamente.

El rango de medición del método es de 5-50 mg/L TOC.

Reactivos

- *Reactivo de acidificación A* de Dr.LANGE
- *Reactivo de disgregación B* (LCK 383 B) de Dr.LANGE

Procedimiento

❖ *Preparación de la muestra*

El pH de la muestra debe estar comprendido entre 4 y 10. La temperatura de la muestra, así como de los reactivos, debe estar entre 15 y 25 ° C.

En caso de dilución de la muestra solamente se emplea agua desionizada (Milli-Q©) libre de carbono. Se procede a la filtración de la muestra con filtros MILLIPORE tipo GS y con un tamaño de poro de 0.22 µm.

❖ *Acidificación*

Se pipetea 5 ml de muestra filtrada y 0.2 ml de reactivo de acidificación en un matraz erlenmeyer de 50 ml. Se agita durante 5 minutos con un imán magnético de tamaño 30·7 mm y con una velocidad de giro del agitador de 750-800 r.p.m.

❖ *Disgregación*

Mediante un dosificador de polvo se agrega una dosis de reactivo de disgregación B en la cubeta de disgregación, se pipetea 2 ml de la muestra acidificada en la cubeta de disgregación. Es necesario invertir varias veces la cubeta para agitar suficientemente.

❖ *Digestión y medición*

Se desenrosca la tapa original de la cubeta y se cierra fuertemente ésta con la tapa de doble membrana, se enrosca en la parte superior la cubeta indicadora, Hay que mantener siempre las cubetas en posición vertical y no invertirlas.

A continuación se calienta la combinación de cubetas en el termostato precalentado a 100 °C, el tiempo de reacción es de 2 horas, una vez transcurrido este tiempo se deja enfriar la combinación de cubetas a temperatura ambiente.

Finalmente se gira la combinación de cubetas, se limpia bien su exterior, se introducen en el espectrofotómetro y se mide frente al aire a una longitud de onda de 435 nm.

En la Figura III. 12 se muestra, a título de ejemplo, una recta de calibrado para el tensioactivo Glucopón 600.

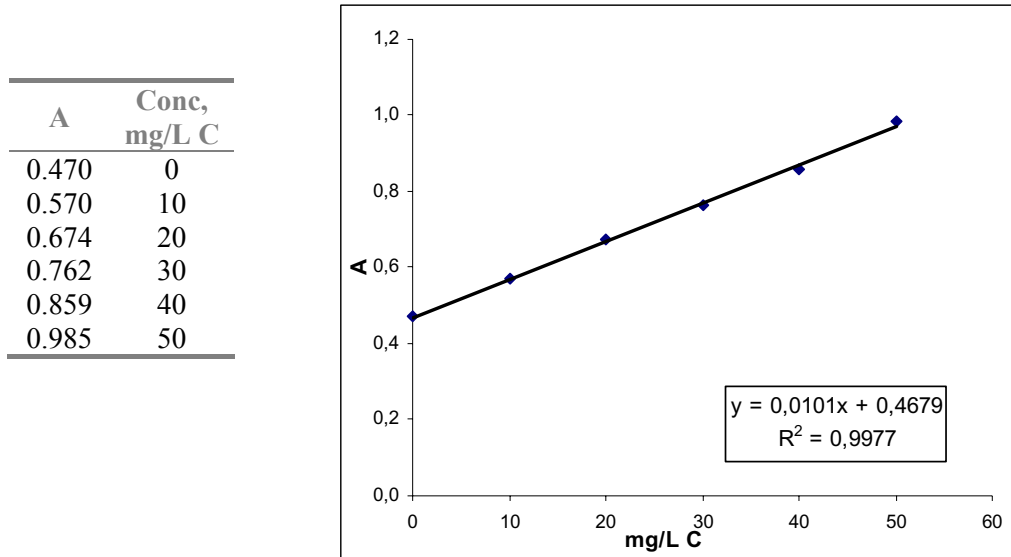


Figura III. 12.- Recta de calibrado por el método del carbono orgánico total

En la Figura III. 13 se muestra un esquema de una cubeta para determinación del TOC, y en la Figura III. 14 una representación simplificada del método de determinación del TOC.

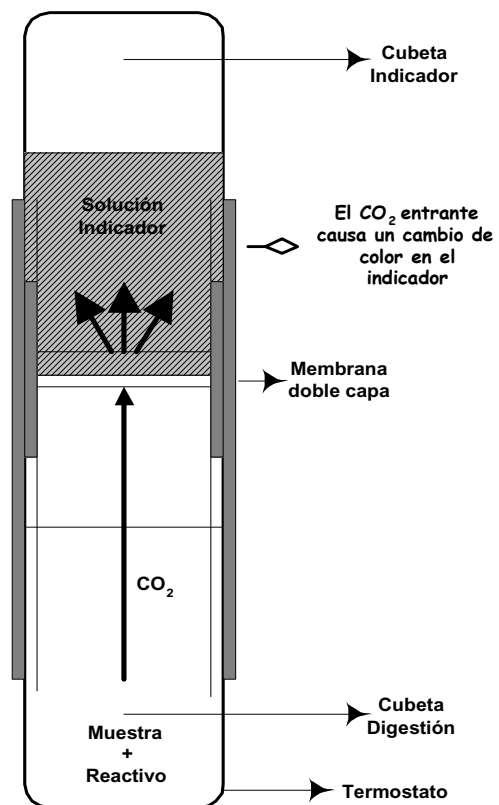


Figura III. 13.- Esquema de una cubeta para determinación del TOC

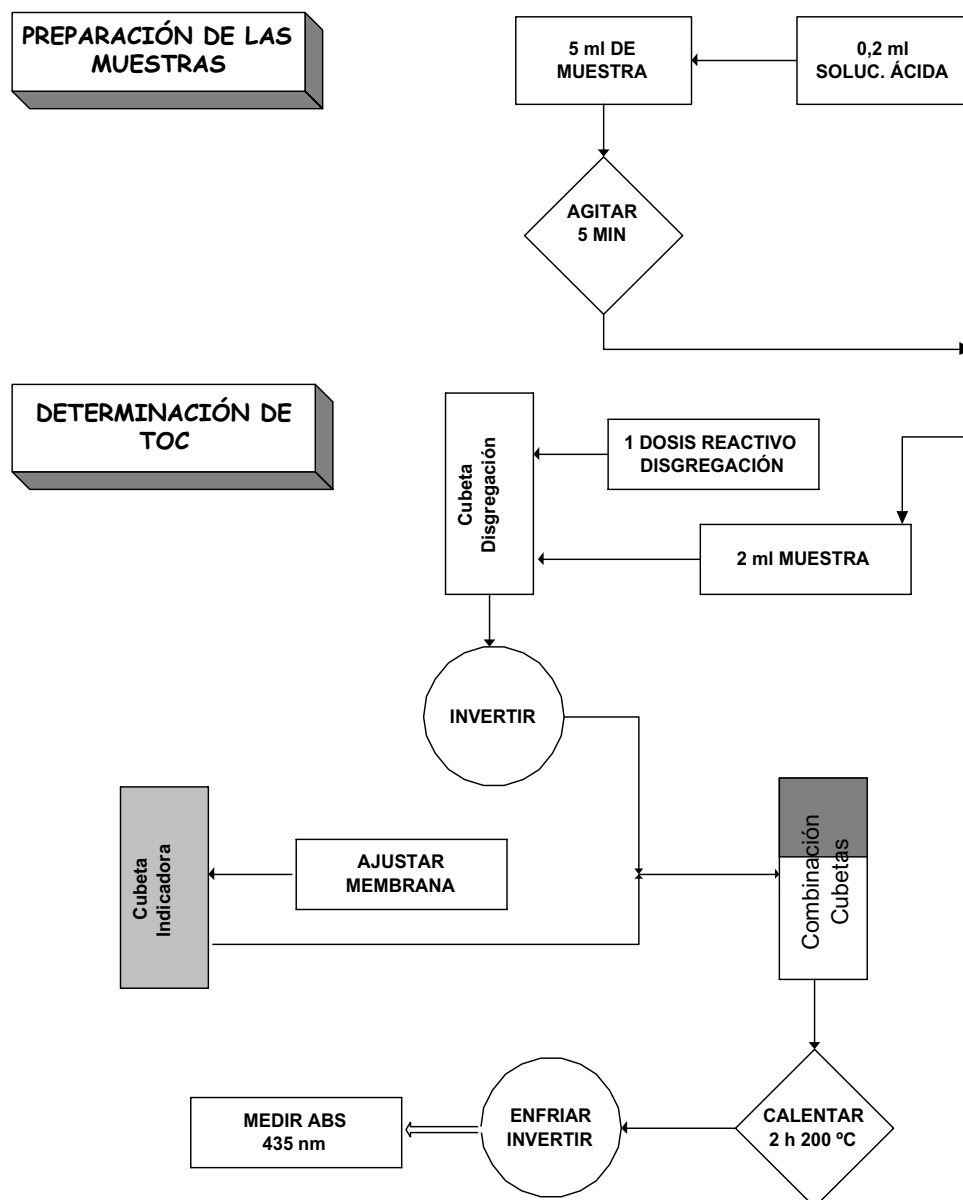


Figura III. 14.- Representación esquemática del método de determinación del TOC

La determinación del TOC se ha utilizado para el seguimiento de la biodegradabilidad de alquilpoliglucósidos durante el ensayo estático, ya que se trata de tensioactivos no iónicos que no se comportan como sustancias activas al yoduro de bismuto y que tampoco reaccionan con el reactivo yodo yoduro.

Sin embargo, se ha encontrado que este método no resulta fiable para la determinación de la biodegradabilidad final de APG, en especial para ensayos de baja concentración de tensioactivo para los que el método del TOC (rango de medición: 5-50 mg/L de TOC) no resulta de utilidad. A modo de ejemplo se muestra la concentración

residual medida como mg/L de TOC y mg/L de GCP 600 en un ensayo estático a una concentración inicial de 12 mg/L, (Figura III. 15).

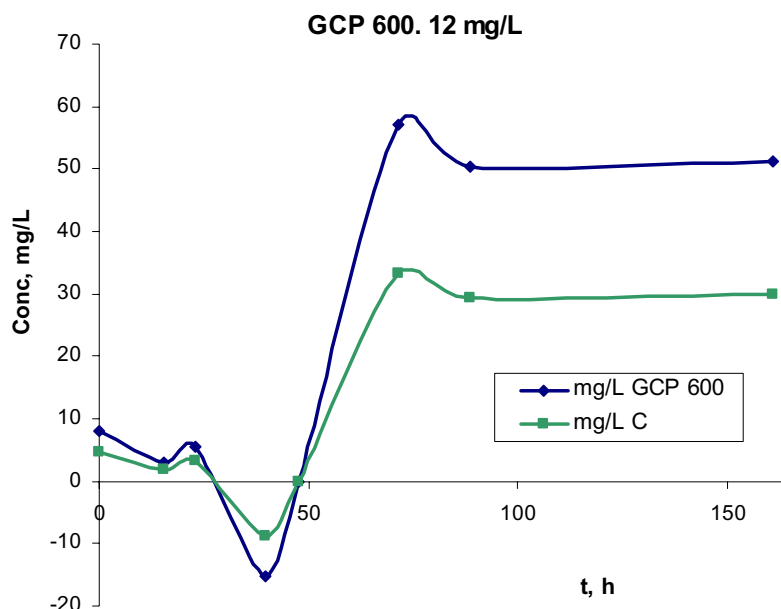


Figura III. 15.- Evolución de la concentración residual en función del tiempo para el tensioactivo GCP 600 a una concentración inicial de 12 mg/L utilizando el método del TOC

3.4.1.5. Demanda biológica de oxígeno (DBO)

La medida de la demanda biológica de oxígeno se ha realizado por el método de la dilución. En general los métodos de la dilución tienen por principio establecer una dilución del agua rica en materias orgánicas con un agua que aporte el oxígeno disuelto en que se mida la cantidad residual, en condiciones operatorias bien determinadas.

Fundamento del método

La demanda biológica de oxígeno se define como la cantidad de oxígeno consumido en las condiciones del ensayo, es decir, después de incubación durante 5 días, a 20 °C y en la oscuridad, para ciertas materias presentes en el agua, principalmente para

asegurar su degradación por vía biológica. La medida de la cantidad de oxígeno consumido se puede seguir en una solución inoculada o no.

Reactivos y disoluciones

- *Agua destilada.*
- *Agua de inoculación* tomada de un depósito colector de una EDAR que opera con aguas residuales urbanas.
- *Solución de fosfatos:* disolver en 1000 ml 8.493 g de monohidrogenofosfato sódico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, P.R.S. de Panreac) y 2.785 g de dihidrogenofosfato potásico (KH_2PO_4 , P.A. de Panreac).
- *Solución de sulfato magnésico* ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, P.R.S. de Panreac) de 20 g/L.
- *Solución de cloruro cálcico* (CaCl_2 , P.A. de Panreac) de 25 g/L.
- *Solución de cloruro de hierro* ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, P.R.S. de Panreac) de 1.5 g/L.
- *Solución de cloruro amónico* (NH_4Cl , P.R.S. de Panreac) de 2g/L.

El agua de dilución se prepara disolviendo en 1000 ml de agua destilada 5 ml de la solución de fosfatos, 1 ml de la solución de sulfato magnésico, 1 ml de la solución de cloruro cálcico, 1 ml de la solución de cloruro de hierro y 1 ml de la solución de cloruro amónico.

Procedimiento

El agua de dilución se mantiene a 20 °C y se airea procurando evitar toda contaminación por metales, materias orgánicas, oxidantes o reductoras. La aireación se detiene cuando la solución contiene 8 mg/L de oxígeno disuelto. Se deja en reposo durante 12 horas manteniendo el recipiente destapado. Posteriormente se añaden 5 ml del agua de inoculación por litro de esta solución. El agua de dilución debe utilizarse dentro de las 24 horas siguientes a su preparación.

A continuación se introduce un volumen conocido de agua a analizar en un frasco Winkler y se completa con el agua de dilución. Se homogeneiza la mezcla y se comprueba que el pH de la solución esté comprendido entre 6 y 8. Se llena completamente el frasco y se tapa sin que entren burbujas de aire. Se preparan igualmente una serie de diluciones sucesivas tales que el consumo de oxígeno esté próximo al 50% del contenido inicial. Se conservan los frascos a 20 °C y en la oscuridad y se mide el oxígeno disuelto subsistente al

cabo de 5 días (120 horas). De forma paralela a la muestra problema se prepara un ensayo en blanco en el que el oxígeno disuelto debe estar comprendido entre 0.5 y 1.5 g/L. En caso contrario, la inoculación con el agua destilada no es conveniente y se necesita modificar la preparación.

3.4.1.6. Oxígeno disuelto

La medida del oxígeno disuelto se realiza mediante una sonda de oxígeno (CRISON OXI 96). La sonda lee el contenido de oxígeno disuelto en mg O₂/L. De forma periódica se anotan los valores de oxígeno disuelto en función del tiempo.

3.4.2. RECUENTO DE LA BIOMASA

Fundamento

Las curvas de crecimiento son un método alternativo para evaluar la biodegradación de tensioactivos cuando éstos son la única fuente de carbono del medio de cultivo. Inicialmente se inocula un pequeño número de microorganismos en el medio y se registra el número de microorganismos viables en función del tiempo.

El modelo de crecimiento basado en el número de células viables tiene cuatro fases más o menos diferenciadas:

- 1) *Fase de retardo*. Tras la adición de un inóculo al medio de cultivo, la fase de retardo representa el tiempo requerido para que los microorganismos se aclimaten a sus nuevas condiciones ambientales.
- 2) *Fase de crecimiento logarítmico*. Durante este periodo, la célula se divide a una velocidad determinada por su tiempo de generación y su capacidad de procesar alimento.
- 3) *Fase estacionaria*. En este caso la población permanece estacionaria. Las razones que se apuntan para este fenómeno son: a) que las células han agotado el sustrato o nutrientes necesarios para el crecimiento, y b) que el crecimiento de nuevas células se nivela por la muerte de células viejas.
- 4) *Fase de muerte logarítmica o crecimiento decreciente*. Durante esta fase la tasa de muerte de las bacterias excede la población de células nuevas. Los

microorganismos se ven forzados a metabolizar su propio protoplasma sin reposición del mismo, ya que la concentración de sustrato disponible se halla en un mínimo. Durante esta fase puede darse el fenómeno llamado *lisis* según el cual los nutrientes que quedan en las células muertas se difunden con objeto de proporcionar alimento a las células existentes.

Reactivos y disoluciones

- *Disolución de NaCl al 0.9%*. NaCl de calidad P.A. de Panreac.
- *Agar nutritivo de Cultimed* suministrado por Panreac.

Equipos

Autoclave

Utilizado para esterilizar el medio de cultivo para el crecimiento de microorganismos así como el material necesario. Autoclave eléctrico semiautomático con temperaturas regulables de 105 a 150 °C. Modelo Autester-G de SELECTA P.

Cabina de flujo laminar horizontal

Utilizada para el cultivo de unidades formadoras de colonias en condiciones estériles en los ensayos estáticos de biodegradación. Permite trabajar en condiciones de esterilidad y en ausencia de partículas mediante un barrido continuo de la zona de trabajo. Incluye lámpara germicida de U.V. Modelo Micro-V de la casa TELSTAR.

Contador de Unidades Formadoras de Colonias (UFC)

Utilizado para el recuento automático de las unidades formadoras de colonias en los ensayos estáticos de biodegradación. De la casa IUL.

Procedimiento

El número de microorganismos viables se obtuvo mediante recuento heterótrofo en placa, expresándose el resultado como unidades formadoras de colonias (UFC) por ml.

El medio de cultivo, agar nutritivo, permite la detección de una amplia variedad de microorganismos. Con una pipeta estéril se toma 1 ml de muestra del cultivo y se hacen una serie de diluciones seriadas 1:10 en CNa al 0.9% hasta alcanzar una dilución de microorganismos entre 30 y 80 células viables por ml de solución de prueba.

Cada dilución se analiza por duplicado: sobre una placa de Petri de 10 cm de diámetro se añade 1 ml de la muestra a analizar. Se vierten, a continuación, 20 ml del medio de cultivo previamente esterilizado, fundido y atemperado a 60°C y se agita suavemente hasta su total homogenización. Se deja enfriar hasta su completa solidificación y se incuba a 25°C durante 72 horas en la oscuridad. El número total de microorganismos se obtiene multiplicando el número de UFC por el factor de dilución correspondiente.

3.4.3. PARÁMETROS DE CONTROL

3.4.3.1. Determinación de sólidos en suspensión

Los sólidos en suspensión son los sólidos retenidos por un filtro de fibra de vidrio después de secado hasta pesada constante a 105 °C. Se utiliza el método de filtración para determinar el contenido de materias en suspensión en medios acuosos del ensayo dinámico de biodegradación.

Fundamento

Se filtra el agua y el peso de materias retenido por el filtro se determina por diferencia de pesada.

Aparatos y reactivos

- ✓ *Dispositivo de filtración a vacío*; bomba de vacío, matraz kitasatos, adaptador y portafiltros de polipropileno.
- ✓ *Probeta graduada* de 100 ml de polietileno o vidrio.
- ✓ *Discos filtrantes de fibra de vidrio borosilicatado* de 47 mm de diámetro, tipo AP 40 de MILLIPORE.
- ✓ *Estufa* de desecación regulable a 103-105 °C de SELECTA.
- ✓ *Balanza* de 0.1 mg de precisión METTLER AE 260.

Procedimiento

En primer lugar se lavan los discos de filtración con agua destilada y se secan en la estufa a 105 °C hasta peso constante, la pesada se hace en una balanza de 0.1 mg de precisión.

Se coloca el filtro en el equipo de filtración y se vierte un volumen medido de muestra bien mezclada entre 10-100 ml. Se separa cuidadosamente el filtro del equipo. Se deja airear el filtro, se seca a 105 °C (una hora al menos), se deja enfriar en el desecador para equilibrar la temperatura y se vuelve a pesar con una precisión de 0.1 mg hasta peso constante.

Expresión de los resultados

El contenido en sólidos en suspensión, en mg/L del agua, viene determinado por la siguiente expresión;

$$[S.S] = \frac{(M_1 - M_0)}{V} \times 1000$$

Ecuación III. 7

donde:

M_0 : Peso del disco filtrante en mg antes de su utilización.

M_1 : Peso del disco filtrante en mg después de su utilización.

V: Volumen de agua filtrada, en ml.

3.4.3.2. Demanda Química de Oxígeno (DQO)

Fundamento

La demanda química de oxígeno es la cantidad de oxígeno consumido por las materias existentes en el agua y oxidables en condiciones operatorias definidas, esto es; digestión a 150 °C con un exceso de dicromato potásico, en medio fuertemente ácido y en presencia de sulfato de plata como catalizador.

Reactivos

- ✓ *Reactivo de ácido sulfúrico*: se disuelven 10 g de sulfato de plata (SO_4Ag_2 , P.R.S. de Panreac) en 1L de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4 , P.A. de Panreac).
- ✓ *Solución de dicromato potásico 0.5 N*: se disuelven 24.6 g de dicromato potásico ($\text{Cr}_2\text{O}_7\text{K}_2$, P.A. de Panreac), previamente desecado a 103 °C durante dos horas, en 1 L de agua destilada.
- ✓ *Solución patrón de ftalato ácido de potasio*: se seca el ftalato ácido de potasio ($\text{C}_6\text{H}_4\text{COOHHCOOK}$, P.A. de Panreac) hasta peso constante a 120 °C. Se disuelven 0.85 g en 1 L de agua destilada. El ftalato ácido de potasio tiene una DQO teórica de 1000 p.p.m. de O_2 .

Procedimiento

En un vial se añade: una espátula de sulfato de mercurio (SO_4Hg_2 , P.R.S. de Panreac), 4 ml de reactivo de ácido sulfúrico y 1 ml de solución de dicromato potásico. El reactivo así preparado es estable al menos durante un mes.

Se introducen los viales en un reactor para la DQO a 150 °C, durante dos horas. Finalizada la digestión se dejan enfriar los viales y a continuación se mide la absorbancia a 620 nm.

La evaluación de los resultados se realiza por medio de una recta de calibrado que da directamente la DQO expresada como $\text{mg O}_2/\text{L}$. A continuación se describe como se prepara la recta patrón;

En una serie de tubos de ensayo se preparan las siguientes disoluciones patrón de ftalato:

Tubo	1	2	3	4	5	6	7	8
Agua destilada, ml	10	9.5	9	8	6	4	2	0
Solución ftalato, ml	0	0.5	1	2	4	6	8	10
DQO, mgO_2/l	0	50	100	200	400	600	800	1000

Tabla III. 11.- Recta de calibrado para la determinación de la DQO

Se añaden 3 ml de cada una de las disoluciones de ftalato incluido el blanco en un tubo con el reactivo para la DQO y se agita para homogeneizar la mezcla de reacción, se introducen los viales en el reactor a 150 °C durante 2 horas y se mide la absorbancia a 620 nm.

En la Figura III. 16 se muestra, a título de ejemplo, una recta de calibrado para la DQO.

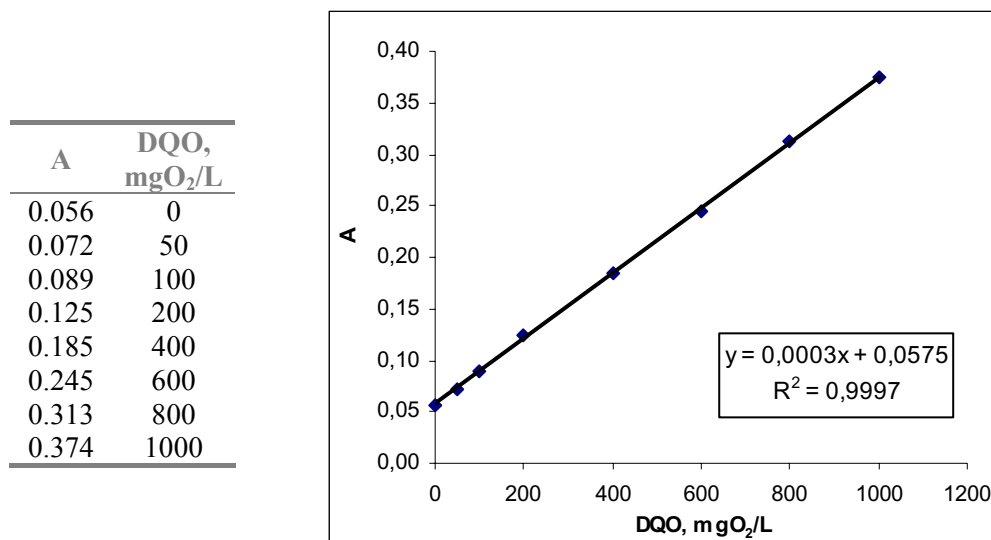


Figura III. 16.- Recta de calibrado para la DQO

3.4.4. DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE CALIDAD DE UN MÉTODO ANALÍTICO

La validación de un método analítico es el proceso que establece, mediante estudios sistemáticos de laboratorio, que las características técnicas de dicho método cumplen las especificaciones relativas al uso previsto de los resultados analíticos (Cuadros, 2002). Es decir, validar implica demostrar la validez del método para el uso específico al que se destine.

La validación implica por tanto una comprobación de la exactitud de los resultados que genera el método de análisis en sus dos componentes (comprobación de la veracidad y estimación de la precisión), a través del establecimiento de los parámetros de calidad.

Para comprobar la bondad del método analítico empleado, se determinan los parámetros de calidad utilizando el modelo de cálculo propuesto por Cuadros y col.

(Cuadros 1993, 1996), que se basan en la utilización del conjunto de datos obtenidos en un experimento de calibración como son:

Linealidad

Es la ausencia de curvatura de la línea de calibración. Tradicionalmente se ha venido midiendo a partir de los coeficientes de correlación (r) y el coeficiente de determinación (R^2). Valores próximos a 1 indican una alta calidad de los datos analíticos. La linealidad puede ser cuantificada a partir de la expresión:

$$LIN(\%) = \left(1 - \frac{S_m}{m} \right) \cdot 100$$

Ecuación III. 8

Donde S_m/m es la desviación estándar relativa a la pendiente.

Sensibilidad

Hay dos formas de expresar la sensibilidad de un método analítico: la sensibilidad de calibración, que mide la relación entre la señal instrumental y la concentración de analito; y la sensibilidad analítica, que es la menor diferencia de concentración que un método analítico puede discernir. La primera se evalúa a partir de la pendiente de calibración, m , y la segunda a partir del cociente S_r/m , donde S_r es la desviación estándar de regresión.

Precisión

La precisión mide el grado de incertidumbre de un resultado analítico. Esta es debida a la dispersión de la señal del instrumento y al uso de valores de la pendiente y la ordenada en el origen estimadas de la recta de calibración para transformar la señal instrumental medida en concentración. Matemáticamente se expresa por la desviación estándar relativa de la concentración, S_c/c y tiene un valor distinto a cada concentración.

Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC)

El límite de detección es la menor concentración que puede detectarse con razonable certeza por un procedimiento analítico determinado. Es la concentración de

analito que da una señal, y , igual a la del blanco, y_0 , más tres veces la desviación estándar del blanco, S_b :

$$y = y_0 + 3 \cdot S_b$$

Ecuación III. 9

El límite de cuantificación se define como la menor concentración de analito que puede ser determinada con aceptable exactitud. Se calcula de la forma descrita en la Ecuación III. 9 pero sustituyendo el 3 por 10.

En los métodos separativos, el error se evalúa a partir del rendimiento (R_a) de la separación, que se define como la relación entre la cantidad, a , separada y la cantidad inicial de a , a_0 :

$$R_a = \frac{a}{a_0}$$

Ecuación III. 10

3.5. DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD

La medida de la toxicidad se ha realizado mediante el ensayo LUMISTox, conforme a la NORMA UNE-EN ISO 11348-2 (UNE-EN ISO 11348-2), utilizando bacterias marinas luminiscentes *Vibrio fischeri* NRRL-B-11177 como microorganismos de prueba.

3.5.1. FUNDAMENTO

La medida de toxicidad se basa en la inhibición de la intensidad luminosa de la bacteria marina de la cepa *Vibrio fischeri* después de un determinado tiempo de exposición con la sustancia tóxica y en comparación con un control no tóxico.

3.5.2. REACTIVOS Y DISOLUCIONES

- ✓ *Bacterias luminiscentes* secadas en líquido de la cepa *Vibrio fischeri* NRRL-B-11177 de DrLANGE. Deben almacenarse en congelador a -18 °C/-20 °C.
- ✓ *Solución de reactivación*; glucosa / cloruro sódico tamponado a pH 7 de DrLANGE.
- ✓ *Solución de NaCl* al 2 %.
- ✓ *Cloruro sódico* (NaCl, P.A. de Panreac).

3.5.3. EQUIPOS

3.5.3.1. LUMISTox

Equipo de medición, unidad de medida y análisis para el test de bacterias luminosas en los ensayos de toxicidad conforme a DIN/EN/ISO 11348-2 (UNE EN ISO 11348-2).

Se utilizó el equipo LUMISTox 300 de DR. LANGE y cubetas de vidrio (LZP 187) de DrLANGE.

3.5.3.2. Unidad de incubación

Bloque termostatzado a 15 °C para mantener a temperatura constante las muestras utilizadas en el LUMISTox 300, cumple con la NORMA internacional ISO DIN 11348 (UNE EN ISO 11348-2).

3.5.4. PROCEDIMIENTO

Reactivación de las bacterias luminiscentes

En primer lugar se descongela la solución de reactivación en un vaso de precipitado con agua, se agita con energía y una vez descongelada se mantiene a 15 °C en la unidad de

incubación durante 15 min. A continuación se sacan las bacterias del congelador y se agita suavemente el vial durante 2 min en un vaso de precipitado con agua a $T < 25$ °C.

Se añaden 0.5 ml de la solución de reactivación al vial de bacterias y se agita suavemente hasta formar una suspensión. Se mantiene el vial en la unidad de incubación durante 15 min. Se mezclan las bacterias en suspensión con el resto de la solución de reactivación y se homogeneiza suavemente. Una vez homogeneizado se añaden 0.5 ml de dicha solución a las cubetas vacías del incubador y se termostatiza durante 15 minutos.

Las bacterias comienzan a emitir luz inmediatamente después de su reconstitución y están listas para su utilización en el ensayo, además las bacterias reactivadas deben utilizarse en un plazo inferior a 4 horas.

Preparación de la muestra y de la serie de dilución

En primer lugar se añaden a la muestra 0.3 g NaCl en forma sólida por cada 15 ml de agua. Se introducen 3 ml de muestra en la cubeta correspondiente del incubador. El pH de la muestra debe ser de 7 ± 0.2 de acuerdo con la normativa, si el pH es inferior a 6.0 o superior a 8.0, se puede producir una inhibición de la luz relacionada con el pH, en este caso se ajusta el pH añadiendo HCl o NaOH. Si las muestras presentan turbidez se filtran o centrifugan antes de realizar el ensayo.

Para la serie de dilución se introducen 1.5 ml de la solución de NaCl al 2% en las cubetas correspondientes y se van transfiriendo 1.5 ml desde la cubeta que contiene la muestra hasta la cubeta en penúltima posición.

Medida

En primer lugar se prepara el LUMIStox, para ello se selecciona el modo de medición EC, la prueba 480 y se cambian los valores de la concentración de la muestra si es necesario.

A continuación se mide la intensidad luminosa a tiempo cero y para tiempos de incubación de 15 y 30 minutos respectivamente. Todas las medidas se realizan por duplicado. El tiempo de contacto de la suspensión de ensayo con las bacterias luminiscentes debe ser el mismo para todas las muestras de la serie de dilución, para ello

debe transcurrir el mismo intervalo de tiempo entre adiciones sucesivas, que suele ser de 20 segundos.

3.5.5. EVALUACIÓN

Efecto Inhibidor sobre las bacterias luminiscentes

Los valores iniciales de intensidad luminosa, medidos para todas las muestras de ensayo, se corrigen mediante un factor que tiene en cuenta la disminución de intensidad luminosa que se produce de forma natural, aún en ausencia de muestra tóxica.

$$f_k = \frac{I_t(0)}{I_0(0)}$$

Ecuación III. 11

donde:

f_k : factor de corrección para el tiempo de incubación de 15 o 30 minutos.

$I_0(0)$: intensidad luminosa a tiempo cero, antes de la adición de la suspensión de bacterias.

$I_t(0)$: intensidad luminosa tras un tiempo de incubación de 15 o 30 minutos.

La intensidad luminosa se expresa en unidades de luminiscencia relativa.

El efecto inhibidor de la muestra de ensayo para un tiempo de incubación t , se calcula mediante la expresión:

$$H_t = \frac{(I_{0t}(c) - I_t(c))}{I_{0t}(c)} \cdot 100$$

Ecuación III. 12

donde

$$I_{0t}(c) = \bar{f}_k \cdot I_0(c)$$

Ecuación III. 13

Siendo \bar{f}_k el factor de corrección promedio de las muestras de control.

Para la evaluación de las relaciones concentración/efecto, se calcula para cada nivel de dilución la función Gamma. Esta función Gamma es la razón entre la intensidad de luz perdida por la solución de bacterias y la que queda después de que éstas han sido expuestas a la acción de una muestra tóxica, y se puede evaluar por la ecuación:

$$\Gamma_t = \frac{\bar{H}_t}{100 - \bar{H}_t} = \frac{f_k \cdot I_0(c) - I_t(c)}{I_t(c)}$$

Ecuación III. 14

siendo:

$I_0(0)$ y $I_t(0)$: lecturas de intensidad luminosa de la cubeta que contiene concentración 0 a tiempo 0 y t.

$I_0(c)$ y $I_t(c)$: lecturas de intensidad luminosa en la cubeta que contiene concentración c a tiempo 0 y t.

De los resultados obtenidos se deduce una relación lineal entre la función Γ y la concentración de tensioactivo empleado de la siguiente forma:

$$\log(c) = b \cdot \log(\Gamma) + \log(a)$$

Ecuación III. 15

Una reducción de luz del 50% corresponde a un valor de $\Gamma = 1$, ya que en este caso la intensidad de luz perdida será igual a la intensidad de luz remanente. En la Figura III. 17 se presenta, a título de ejemplo, la linealización para el tensioactivo Findet 1214N/23.

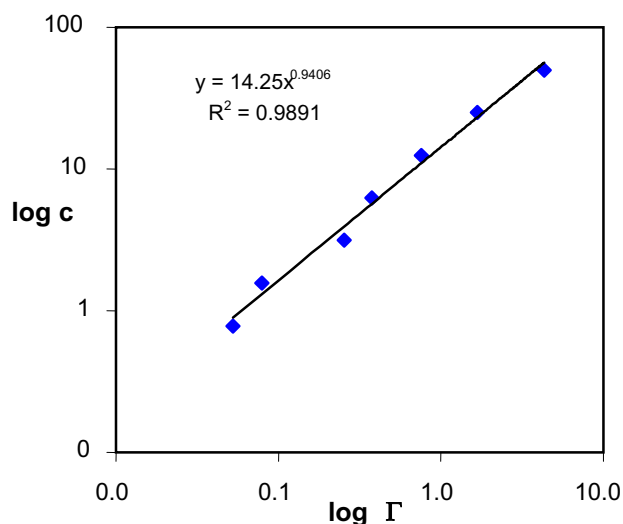


Figura III. 17.- Relación lineal entre la función Γ y la concentración para el tensioactivo Findet 1214N/23

3.5.5.2. Determinación de los valores de EC

El valor de la toxicidad se mide como EC_{50} y EC_{20} que son, respectivamente, la concentración de tensioactivo en mg/L que produce una inhibición del 50% y del 20% después de 15 ó 30 minutos de exposición con el tóxico. Los valores de EC_{50} y EC_{20} se calculan dando a Γ los valores 1 y 0.25, respectivamente.

3.5.5.3. Determinación de la toxicidad durante el proceso de biodegradación

Durante el proceso de biodegradación del tensioactivo se analizó la evolución de la toxicidad de los metabolitos generados. Los resultados obtenidos para este caso se determinaron como la dilución de la muestra, (expresada en tanto por ciento, D_{50}) que produce una inhibición del 50%, unidades Equitox/m³. Esta forma de expresar la toxicidad presenta la ventaja de que su valor es mayor cuanto mayor es la toxicidad de la muestra. En estos casos la toxicidad de la muestra se calcula a partir de la expresión:

$$TU = \frac{1}{D_{50}(\%)} 100, \text{Equitox/m}^3$$

Ecuación III. 16

3.6. PROTOCOLO DE LIMPIEZA

Limpieza del material corriente de laboratorio

Todo el material corriente de laboratorio, usado en ensayos o en análisis, se somete a un protocolo de limpieza para eliminar cualquier resto de agentes de superficie que pueda interferir en los resultados de los análisis. El protocolo seguido es el siguiente:

- Limpieza del material de vidrio con mezcla crómica (H_2SO_4 , $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) de Scharlau Chemie, S.A.
- Enjuague con agua corriente.
- Enjuague final con agua desionizada.

Finalmente antes de usar el material, éste se seca en una estufa hasta que quede perfectamente seco.

Limpieza del aparato de extracción en corriente gaseosa

El protocolo de limpieza de la columna y el disco de vidrio sinterizado es el siguiente:

- Burbujeo y enjuague con metanol (Calidad Q.P.) de Panreac para eliminar cualquier resto de tensioactivo.
- Enjuague con disolución alcalina de EDTA 0.1 M. pH 10 (Wyrwas, 1993).
- Enjuague con disolución etanólica de HCl al 10 % en peso.
- Enjuague final con agua desionizada.

Limpieza de los crisoles filtrantes de vidrio sinterizado

Los crisoles de vidrio sinterizado utilizados en el análisis de tensioactivos no iónicos por el método de Wickbold se limpian al finalizar cada sesión, según el siguiente protocolo;

- Tras pasar 24 h sumergidos en una disolución alcalina de EDTA 0.1 M, se filtra una pequeña cantidad de la misma para garantizar que el filtro esté libre de cualquier ión metálico.
- Filtración con metanol para eliminar cualquier resto de tensioactivo que pudiese quedar absorbido.
- Enjuague y filtración con agua desionizada.

4. RESULTADOS

En este capítulo se indican los resultados experimentales primarios obtenidos en los ensayos de biodegradación y toxicidad. En el apartado 4.1. se presentan los resultados correspondientes a los ensayos de biodegradación de tensioactivos separados en cinco bloques principales: biodegradabilidad de alcoholes grasos etoxilados, biodegradabilidad de nonilfenol polietoxilado, biodegradabilidad de alquilpoliglucósidos, biodegradabilidad del LAS y biodegradabilidad de mezclas de alcoholes grasos etoxilados y alquilpoliglucósidos.

En el apartado 4.2. se presentan los resultados correspondientes a la toxicidad de tensioactivos, y en el apartado 4.3. los resultados de toxicidad de tensioactivos durante el proceso de biodegradación.

4.1. BIODEGRADABILIDAD DE TENSIOACTIVOS

Para la presentación de los resultados de biodegradabilidad de tensioactivos las tablas muestran el tensioactivo ensayado, el tipo de ensayo de biodegradación empleado, el método empleado para la medida de la concentración de tensioactivo o para el seguimiento de la biodegradabilidad, la identificación del experimento y las condiciones generales en las que se ha realizado el ensayo.

4.1.1. BIODEGRADABILIDAD DE ALCOHOLES GRASOS ETOXILADOS (AGE)

En la Tabla IV. 1 y Tabla IV. 2 se muestran los resultados de los ensayos de biodegradación para el tensioactivo Findet 10/15, en la Tabla IV. 3 aparecen los resultados para el Findet 10/18. De la Tabla IV. 4 a la Tabla IV. 6 se muestran los resultados correspondientes para el Findet 1618A/18. Para los tensioactivos Findet 1618A/23 y Findet 1214N/16 los resultados de biodegradabilidad se muestran en la Tabla IV. 7 y Tabla IV. 8 respectivamente. Finalmente los resultados de biodegradabilidad correspondientes al Findet 1214N/23 aparecen en la Tabla IV. 9 a la Tabla IV. 11.

Para estudiar el efecto de la concentración sobre la biodegradabilidad se han realizado, para algunos tensioactivos, ensayos de biodegradación a diferentes concentraciones iniciales de ensayo, comprendidas entre 5 y 50 mg/L.

Tabla IV. 1.- Ensayo estático de biodegradación para el tensioactivo Findet 10/15. Método del yodo-yoduro

TENSIOACTIVO: FINDET 10/15 ENSAYO DE BIODEGRADACIÓN: Estático MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN: Método del yodo-yoduro Identificación del experimento: F1 Condiciones del ensayo: 25 °C, Oscuridad, Agitación orbital	
Concentración inicial: 5 mg/L	
Tiempo, h	Conc, mg/L
0.00	3.762
13.00	2.270
37.00	2.728
61.00	2.321
85.00	0.734

Tabla IV. 2.- Ensayo estático de biodegradación para el tensioactivo Findet 10/15. Método de Wickbold

TENSIOACTIVO: FINDET 10/15 ENSAYO DE BIODEGRADACIÓN: Estático MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN: Método de Wickbold potenciométrico con el Reactivo de Dragendorff Identificación del experimento: F1 Condiciones del ensayo: 25 °C, Oscuridad, Agitación orbital	
Concentración inicial: 5 mg/L	
Tiempo, h	Conc, mg/L
0.00	2.128
37.00	1.756
61.00	0.520
70.00	0.100
111.00	0.205
157.00	0.135

Tabla IV. 3.- Ensayo estático de biodegradación para el tensioactivo Findet 10/18. Método del yodo-yoduro

TENSIOACTIVO: FINDET 10/18 ENSAYO DE BIODEGRADACIÓN: Estático MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN: Método del yodo-yoduro Identificación del experimento: F2 Condiciones del ensayo: 25 °C, Oscuridad, Agitación orbital	
Concentración inicial: 5 mg/L	
Tiempo, h	Conc, mg/L
0.00	2.800
9.00	2.970
21.00	2.520
46.00	1.000
70.50	0.400
98.50	0.550
142.50	0.300
165.50	0.000
190.50	0.000

Tabla IV. 4.- Ensayo estático de biodegradación para el tensioactivo Findet 1618A/18.
Método del yodo-yoduro. Influencia de la concentración

TENSIOACTIVO: FINDET 1618A/18 ENSAYO DE BIODEGRADACIÓN: Estático MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN: Método del yodo-yoduro MEDIDA DE LA BIOMASA: Recuento de UFC Identificación: F3, F4, F5 Condiciones del ensayo: 25 °C, Oscuridad, Agitación orbital							
Conc. inicial: 5 mg/L			Conc. inicial: 25 mg/L			Conc. inicial: 50 mg/L	
Tiempo, h	Conc., mg/L	Biomasa UFC/ml	Tiempo, h	Conc., mg/L	Biomasa UFC/ml	Tiempo, h	Conc., mg/L
0.00	4.458	1750	0.00	24.674	15000	0.00	44.817
14.75	4.580	21500	4.50	26.193	3845	15.00	47.853
22.75	1.634	19350	20.50	24.895	21025	23.00	44.302
39.25	0.876	33000	28.50	12.403	67000	39.50	27.136
46.25	--	416000	46.50	4.591	78875	70.50	17.632
70.25	0.304	36000	53.00	3.519	--	87.50	13.273
87.25	0.188	20000	70.50	2.447	--	113.50	7.737
113.25	0.347	--	93.000	3.020	341000	159.50	4.468
159.25	0.296	--	166.50	1.811	--	184.16	3.462
183.91	0.401	475000	189.50	1.310	573500	236.00	3.462
			213.50	1.998	1125000		
			237.50	1.083	1250000		

Tabla IV. 5.- Ensayo dinámico de biodegradación para el tensioactivo Findet 1618A/18.

Método de Wickbold

TENSIOACTIVO: FINDET 1618A/18 ENSAYO DE BIODEGRADACIÓN: Dinámico MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN: Método de Wickbold potenciométrico con el Reactivo de Dragendorff Identificación: F15 Condiciones del ensayo: Temperatura ambiente				
Concentración inicial: 10 mg/L				
t, horas	Conc., mg	Biodeg., %	O ₂ disuelto, mg/L	S.S., mg/L
0.00	0.068	99.317	3.80	1580
24.50	0.176	98.244	3.20	1760
47.50	0.224	97.763	3.00	1570
71.50	0.229	97.714	4.50	3230
98.00	0.284	97.162	3.30	1780
143.00	0.202	97.982	2.90	2490
167.00	0.197	98.033	1.90	2440
191.50	0.222	97.781	4.60	1470
214.00	0.124	98.760	4.50	1950
239.50	0.272	97.280	3,70	1480
265.00	0.248	97.520	2.00	1740
312.00	0.116	98.839	2.10	1080
336.50	0.181	98.193	2.40	880
362.00	0.106	98.936	2.80	1110
386.00	0.147	98.528	3.20	3580
409.00	0.090	99.101	1.70	1100
434.00	0.124	98.755	2.80	2360
482.50	0.156	98.438	4.80	3150
505.50	0.168	98.324	3.80	3810
554.00	0.146	98.544	3.70	4440
575.50	0.140	98.598	4.00	4510

Tabla IV. 6.- Ensayo respirométrico para el tensioactivo Findet 1618A/18.
Influencia de la concentración

TENSIOACTIVO: FINDET 1618A/18			
MÉTODO DE ENSAYO: Respirometría manométrica			
MÉTODO DE ANÁLISIS: DBO			
Identificación: F17			
Condiciones del ensayo: 25 °C, Oscuridad, Agitación			
Tiempo, h	D.B.O., mgO₂/l		
	Blanco	Conc. inicial: 25 mg/L	Conc. inicial: 50 mg/L
0.00	0.0	0.0	0.0
0.75	0.0	0.0	0.0
2.25	0.0	0.0	0.0
21.33	0.0	0.0	0.0
46.00	0.0	0.0	0.0
53.00	0.0	0.0	0.0
70.00	0.0	0.0	0.0
96.00	0.0	0.5	0.0
141.33	0.0	8.2	1.0
146.67	0.0	9.3	6.0
152.00	0.0	11.5	12.0
166.08	0.0	13.7	14.0
177.17	0.0	16.4	14.0
189.83	0.0	19.7	18.0
193.33	0.0	19.7	18.0
213.33	0.0	16.9	15.0
215.75	0.0	19.1	21.0
218.00	0.0	22.4	29.0
221.00	0.0	19.7	21.0
237.75	0.0	18.6	21.0
311.83	0.0	20.8	26.0

Tabla IV. 7.- Ensayo estático de biodegradación para el tensioactivo Findet 1618A/23.

Método del yodo-yoduro

TENSIOACTIVO: FINDET 1618A/23 ENSAYO DE BIODEGRADACIÓN: Estático MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN: Método del yodo-yoduro MEDIDA DE LA BIOMASA: Recuento de UFC Identificación: F6 Condiciones del ensayo: 25 °C, Oscuridad, Agitación orbital		
Concentración inicial: 5 mg/L		
Tiempo, h	Conc., mg/L	Biomasa, UFC/ml
0.00	5.234	0
8.00	4.927	0
22.50	5.285	0
27.00	5.250	--
31.25	4.943	10450
47.00	0.773	910000
56.00	0.521	344000
71.00	0.683	1527500
79.75	0.557	--
98.00	0.430	3960000
143.00	0.209	2183334
167.50	0.553	2500
191.50	0.437	6500
215.50	0.528	1000000
239.50	0.517	780000

Tabla IV. 8.- Ensayo estático de biodegradación para el tensioactivo Findet 1214N/16.
Método del yodo-yoduro. Influencia de la concentración

TENSIOACTIVO: FINDET 1214N/16 ENSAYO DE BIODEGRADACIÓN: Estático MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN: Método del yodo-yoduro MEDIDA DE LA BIOMASA: Recuento de UFC Identificación: F7, F8, F9 Condiciones del ensayo: 25 °C, Oscuridad, Agitación orbital								
Conc. inicial: 5 mg/L			Conc. inicial: 25 mg/L			Conc. inicial: 50 mg/L		
Tiempo, h	Conc., mg/L	Biomasa, UFC/ml	Tiempo, h	Conc., mg/L	Biomasa, UFC/ml	Tiempo, h	Conc., mg/L	Biomasa, UFC/ml
0.00	4.558	2050	0.00	28.343	265	0.00	46.665	295
14.50	5.159	1000	15.75	25.451	3065	5.75	52.287	30
22.50	1.250	43200	23.25	25.027	102500	21.50	47.080	540
38.50	0.741	3710000	39.50	14.350	--	29.25	46.874	261500
43.50	0.515	--	47.00	11.944	--	45.75	39.172	8240000
62.50	0.408	880000	64.00	7.260	6500000	53.25	36.346	1048000
66.50	0.450	--	71.00	6.458	--	69.75	37.843	--
86.50	0.462	125000	87.50	5.087	--	78.75	37.264	--
182.50	0.334	--	159.50	2.186	70800000	94.25	37.261	895000
			185.00	1.801	8260000	119.75	33.285	--
			209.50	1.839	7550000	165.75	33.947	1165000
						189.50	34.306	5875000
						213.75	27.426	7607500
						237.50	27.310	7645000
						262.25	23.501	4342500
						334.25	15.832	--
						358.25	17.698	--
						381.75	19.297	--

Tabla IV. 9.- Ensayo estático de biodegradación para el tensioactivo Findet 1214N/23. Método del yodo-yoduro. Influencia de la concentración

TENSIOACTIVO: FINDET 1214N/23 ENSAYO DE BIODEGRADACIÓN: Estático MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN: Método colorimétrico del yodo-yoduro MEDIDA DE LA BIOMASA: Recuento de UFC Identificación: F10, F11, F12, F13, F14 Condiciones del ensayo: 25 °C, Oscuridad, Agitación orbital														
Conc. inicial:			Conc. inicial:			Conc. inicial:			Conc. inicial:			Conc. inicial:		
5 mg/L			15 mg/L			20 mg/L			25 mg/L			50 mg/L		
t, h	Conc., mg/L	t, h	Conc., mg/L	Biom., UFC/ml	t, h	Conc., mg/L	Biom., UFC/ml	t, h	Conc., mg/L	t, h	Conc., mg/L	Biom., UFC/ml		
0.0	4.57	0.0	14.55	4300	0.0	19.13	498	0.0	23.7	0.0	47.0	80250		
22.5	3.37	15.0	15.26	1000	6.5	18.55	255	15.0	19.6	16.0	48.6	243600		
33.0	1.61	23.2	13.27	55250	22.5	17.62	--	24.2	9.0	23.5	48.1	1100000		
46.5	0.35	39.0	2.17	7500000	26.5	--	221667	35.7	3.0	39.7	31.8	--		
58.2	0.42	63.5	1.41	5350000	31.0	6.72	1205000	51.2	2.0	49.0	28.2	--		
70.2	0.47	87.5	2.05	1314000	46.5	2.08	2260000	60.2	2.7	65.0	24.1	2765000		
85.0	0.50	159.5	0.96	2870000	54.5	1.24	3020000	75.2	3.5	72.0	23.5	--		
					73.7	1.76	--	160.0	3.5	92.0	20.0	91500		
					78.8	1.82	15700000			136.0	15.8	1170000		
					95.3	2.33	13350000			160.0	13.3	1819500		
					167.5	1.95	3260000			184.0	12.2	12579334		
					198.5	1.76	1580000			209.0	9.5	4180000		
										232.0	6.6	5035000		
										305.0	6.125	--		
										328.0	4.538	--		
										353.0	4.761	--		
										376.0	4.450	--		

Tabla IV. 10.- Ensayo estático de biodegradación para el tensioactivo Findet 1214N/23. Método de Wickbold. Influencia de la concentración.

TENSIOACTIVO: FINDET 1214N/23 ENSAYO DE BIODEGRADACIÓN: Estático MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN: Método de Wickbold con el Reactivo de Dragendorff potenciométrico Identificación: F10, F11, F13 Condiciones del ensayo: 25 °C, Oscuridad, Agitación orbital					
Conc. inicial: 5 mg/L		Conc. inicial: 15 mg/L		Conc. inicial: 25 mg/L	
Tiempo, h	Conc., mg/L	Tiempo, h	Conc., mg/L	Tiempo, h	Conc., mg/L
0.00	4.650	0.00	11.289	0.00	26.130
22.50	4.358	15.00	17.451	15.00	22.509
33.00	0.990	23.25	9.625	24.25	19.525
46.50	0.456	39.00	1.087	35.75	1.333
56.00	0.275	48.00	0.188	51.25	0.471
70.25	0.236	63.50	0.327	60.25	0.303
109.00	0.153	87.50	0.011	75.25	0.243
		111.50	0.037	101.58	0.137
		159.50	0.001		

Tabla IV. 11.- Ensayo dinámico de biodegradación para el tensioactivo Findet 1214N/23. Método de Wickbold.

TENSIOACTIVO: FINDET 1214N/23 ENSAYO DE BIODEGRADACIÓN: Dinámico MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN: Método de Wickbold espectrofotométrico con el Reactivo de Dragendorff Identificación: F16 Condiciones del ensayo: Temperatura ambiente								
Conc. inicial: 10 mg/L								
Día	Conc., mg	Biodeg., %	O ₂ , mg/L	S.S., mg/L	D.Q.O., mgO ₂ /l		D.B.O., mgO ₂ /l	
					Agua Bruta	Agua Tratada	Agua Bruta	Agua Tratada
1	0.172	98.453	7.1	2730	321	65	169	5
2	0.090	99.553	4.2	2800	--	--	--	--
3	0.550	96.078	5.5	3380	278	31	--	--
4	0.210	97.628	1.8	2540	--	--	--	--
5	0.140	98.528	3.4	2230	261	28	--	--
6	0.095	99.003	3.6	--	--	--	--	--
7	0.097	99.178	3.0	--	--	--	241.7	12.5
8	0.186	98.113	3.2	2130	261	41	--	--
9	0.099	98.938	3.8	2010	--	--	--	--
10	0.076	99.213	7.9	2930	321	65	--	--
11	0.194	98.008	6.2	2420	--	--	--	--
12	--	--	3.1	2390	301	28	--	--
13	99.099	99.100	0.3	--	--	--	--	--
14	99.840	99.800	4.7	--	--	--	175	7
15	98.034	98.000	6.2	2570	244	12	--	--
16	99.007	99.000	6.7	2610	--	--	--	--
17	98.936	98.900	--	3270	267	5	--	--
18	98.252	98.300	--	3450	--	--	--	--
19	99.067	99.100	--	3420	281	11	--	--
20	98.745	98.800	--	--	--	--	--	--
21	--	--	--	--	--	--	125	5
22	99.100	99.100	--	4570	230	9	--	--
23	98.780	98.800	--	3480	--	--	--	--
24	--	--	--	--	298	11	--	--
29	--	--	--	--	--	--	112	0
36	--	--	--	--	--	--	119	0
43	--	--	--	--	--	--	150	5

4.1.2. BIODEGRADABILIDAD DEL NONILFENOL POLIETOXILADO (NPEO)

En la Tabla IV. 12 Y Tabla IV. 13 se muestran los resultados experimentales obtenidos durante el ensayo estático de biodegradación para el NPEO. El análisis del tensioactivo se ha realizado por el método del yodo-yoduro (Tabla IV. 12) y por el método de Wickbold (Tabla IV. 13). Para analizar el efecto de la concentración los experimentos se realizaron a concentraciones iniciales de tensioactivo de 5, 25 y 50 mg/L.

Tabla IV. 12.- Ensayo estático de biodegradación para el tensioactivo NPEO. Método del yodo-yoduro. Influencia de la concentración

TENSIOACTIVO: NONILFENOL POLIETOXILADO ENSAYO DE BIODEGRADACIÓN: Estático MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN: Método del yodo-yoduro MEDIDA DE LA BIOMASA: Recuento de UFC Identificación: N1, N2, N3 Condiciones del ensayo: 25 °C, Oscuridad, Agitación orbital								
Conc. inicial: 5 mg/L			Conc. inicial: 25 mg/L			Conc. inicial: 50 mg/L		
Tiempo, h	Conc., mg/L	Biomasa, UFC/ml	Tiempo, h	Conc., mg/L	Biomasa, UFC/ml	Tiempo, h	Conc., mg/L	Biomasa, UFC/ml
0.00	3.818	5800	0.00	23.072	450	0.00	43.058	1745
14.50	3.956	600	16.00	24.571	24300	5.75	45.970	325
22.50	4.050	2200	23.25	22.328	149000	21.50	43.046	22950
38.50	4.204	--	39.75	21.612	167000	29.25	44.412	318.500
43.00	3.478	--	49.00	21.144	116000	45.75	36.744	1095000
62.50	0.336	695000	65.00	11.102	238000	53.25	19.853	5.465000
66.50	0.373	--	72.00	5.044	3240000	69.75	17.427	5520000
86.50	0.196	460000	87.50	--	2565000	78.75	17.095	--
182.50	0.053	--	92.00	3.874	--	94.25	16.653	50000
			136.50	2.391	--	119.75	11.430	--
			160.00	3.081	2900000	165.75	8.887	5070000
			184.00	2.446	665000	189.50	7.446	5180000
			209.00	2.215	1530000	213.75	6.599	6280000
			232.00	0.700	--	237.50	7.250	5650000
			305.00	1.000	--	262.25	5.942	--
			328.00	0.528	--	334.25	2.440	--

Tabla IV. 13.- Ensayo estático de biodegradación para el tensioactivo NPEO. Método del Wickbold

TENSIOACTIVO: NONILFENOL POLIETOXILADO ENSAYO DE BIODEGRADACIÓN: Estático MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN: Método de Wickbold espectrofotométrico con el Reactivo de Dragendorff Identificación: N1 Condiciones del ensayo: 25 °C, Oscuridad, Agitación orbital	
Concentración inicial: 5 mg/L	
Tiempo, h	Conc., mg/L
0.00	4.234
15.00	4.031
20.00	3.525
25.00	3.755
39.25	3.569
49.00	2.552
63.00	2.568
87.00	0.276
113.08	0.362
159.75	0.219

4.1.3. BIODEGRADABILIDAD DE ALQUILPOLIGLUCÓSIDOS (APG)

En la Tabla IV. 14 a Tabla IV. 17 se muestran los resultados experimentales obtenidos durante el ensayo estático de biodegradación y mediante el método de la botella cerrada para los APG. El análisis del tensioactivo se ha realizado por el método del TOC y midiendo el oxígeno disuelto respectivamente. Para analizar el efecto de la concentración los experimentos se realizaron a concentraciones iniciales de tensioactivo de 12, 20 y 100 mg/L.

Tabla IV. 14.- Ensayo estático de biodegradación y método de la botella cerrada para el tensioactivo GCP 215. Método del TOC

TENSIOACTIVO: GCP 215				
ENSAYO DE BIODEGRADACIÓN: Estático y Método de la Botella Cerrada				
MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN: TOC				
MEDIDA DE LA BIOMASA: Recuento de UFC				
Identificación: G1				
Condiciones del ensayo: 25 °C, Oscuridad, Agitación orbital				
Conc. inicial: 12 mg/L				
Tiempo, h	Conc., mg/L	O₂ Dis. Blanco, mgO₂/l	O₂ Dis. Muestra, mgO₂/l	Biomasa, UFC/ml
0.00	14.409	5.2	5.6	1367.50
3.00	--	4.4	5.1	--
6.50	8.504	4.5	4.3	1757.50
9.50	--	4.4	4.0	--
22.75	12.761	4.5	3.9	173500
26.50	--	4.3	3.8	--
30.00	12.486	4.4	3.7	229500
46.50	8.902	4.4	2.5	1320000
54.00	7.543	4.1	2.3	1210000
71.00	--	4.0	1.3	--
73.00	3.835	4.0	1.3	181500
142.75	4.522	4.0	1.0	66500
150.00	--	4.1	1.1	--
167.50	1.776	4.0	1.1	155000
190.75	--	4.0	1.1	455000

Tabla IV. 15.- Ensayo estático de biodegradación y método de la botella cerrada para el tensioactivo GCP 600. Método del TOC. Influencia de la concentración

TENSIOACTIVO: GCP 600 ENSAYO DE BIODEGRADACIÓN: Estático y Método de la Botella Cerrada MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN: TOC MEDIDA DE LA BIOMASA: Recuento de UFC Identificación: G2, G3 Condiciones del ensayo: 25 °C, Oscuridad, Agitación orbital							
Concentración inicial: 12 mg/L				Concentración inicial: 100 mg/L			
t, h	O ₂ Dis. Blanco, mgO ₂ /l	O ₂ Dis. Muestra, mgO ₂ /l	Biomasa, UFC/ml	t, h	Conc., mg/L	O ₂ Dis. Muestra, mgO ₂ /l	Biomasa, UFC/ml
0.00	7.4	8.6	1510	0.00	99.46	7.2	2450
2.00	4.0	6.5	--	1.25	--	6.7	--
6.50	4.1	6.4	51350	3.00	--	5.2	--
9.00	3.8	5.9	--	15.50	155.78	5.2	271000
22.50	3.7	5.5	277250	19.00	--	5.1	--
26.00	3.6	4.9	--	23.00	131.01	4.7	455000
30.50	3.5	4.7	565250	39.50	56.71	4.4	1945000
33.00	3.5	3.9	--	42.25	--	4.2	--
47.50	3.5	2.2	695000	44.25	--	4.1	--
50.00	3.2	2.1	--	47.50	47.21	3.9	2420000
70.50	3.1	1.2	123500	49.50	--	3.9	--
73.50	3.0	1.0	--	63.50	--	0.4	5177500
95.25	3.1	0.7	45500	66.00	--	0.0	--
142.75	2.9	0.3	170000	71.25	57.02	--	3640000
150.00	2.9	0.3	--	88.50	50.40	--	4017000
169.00	2.8	0.2	410000	161.0	51.80	--	3920000
191.00	2.8	0.1	635000				
214.00	2.7	0.1	--				

Tabla IV. 16.- Método de la botella cerrada para el tensioactivo GCP 650

TENSIOACTIVO: GCP 650			
ENSAYO DE BIODEGRADACIÓN: Método de la Botella Cerrada			
MEDIDA DE LA BIOMASA: Recuento de UFC			
Identificación: G4			
Condiciones del ensayo: 25 °C, Oscuridad, Agitación orbital			
Conc. inicial: 12 mg/L			
Tiempo, h	O₂ Dis. Blanco, mgO₂/l	O₂ Dis. Muestra, mgO₂/l	Biomasa, UFC/ml
0.00	7.4	8.1	3172.50
2.00	4.0	6.7	--
6.00	4.1	7.2	20775
9.00	3.8	6.9	--
22.25	3.7	5.2	386000
26.00	3.6	4.8	--
30.50	3.5	4.6	690000
33.00	3.5	4.2	--
47.50	3.5	3.3	380000
50.00	3.2	3.2	--
70.50	3.1	3.0	43575
73.50	3.1	2.4	--
95.25	3.1	2.5	28500
142.75	2.9	2.3	80000
150.00	2.9	2.4	--
167.50	--	--	30000
169.00	2.8	2.4	--
191.00	2.8	2.3	285000
214.00	2.7	1.9	--

Tabla IV. 17.- Estático y Método de la botella cerrada para el tensioactivo GCP 650

TENSIOACTIVO: GCP 650				
ENSAYO DE BIODEGRADACIÓN: Estático y Método de la Botella Cerrada				
MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN: TOC				
MEDIDA DE LA BIOMASA: Recuento de UFC				
Identificación: G5				
Condiciones del ensayo: 25 °C, Oscuridad, Agitación orbital				
Concentración inicial: 20 mg/L				
Tiempo, h	Conc., mg/L	O₂ Dis. Blanco, mgO₂/l	O₂ Dis. Muestra, mgO₂/l	Biomasa, UFC/ml
0.00	15.393	5.6	4.7	1753
0.50	--	5.7	4.5	--
3.50	--	5.6	4.5	--
6.50	38.272	5.3	4.4	945
8.50	--	5.9	4.7	--
22.75	34.765	--	--	151000
23.25	--	5.7	4.2	--
24.25	--	5.6	4.0	--
30.50	--	5.4	4.1	642500
32.00	--	5.6	4.1	--
33.25	--	5.4	3.9	--
47.00	--	5.3	3.6	665000
49.00	--	5.4	3.2	--
54.75	32.928	5.9	3.2	393500
56.25	--	5.5	3.0	--
71.00	--	5.2	1.9	500000
94.75	--	5.9	0.9	4300000
147.00	--	5.8	0.7	--
167.75	17.898	5.8	0.9	14200000
190.75	17.564	4.9	0.7	15200000
215.00	13.222	5.8	0.8	7242500

En la Tabla IV. 18 a Tabla IV. 20 se muestran los resultados experimentales de biodegradabilidad obtenidos para los APG mediante el método respirométrico manométrico. El análisis del tensioactivo se ha realizado analizando la DBO. Para estudiar el efecto de la concentración los experimentos se realizaron a concentraciones iniciales de tensioactivo de 15, 25, 50, 75 y 100 mg/L, excepto para el GCP 650 que solo se analizó a 50 mg/L.

Tabla IV. 18.- Ensayo respirométrico de biodegradación para el tensioactivo GCP 215.
Influencia de la concentración

TENSIOACTIVO: GCP 215						
MÉTODO DE ENSAYO: Respirometría manométrica						
MÉTODO DE ANÁLISIS: DBO						
Identificación: RM1						
Condiciones del ensayo: 25 °C, Oscuridad, Agitación						
Tiempo, h	D.B.O., mgO₂/l					
	Blanco	Conc. Inicial:	Conc. Inicial:	Conc. Inicial:	Conc. Inicial:	Conc. Inicial:
		15 mg/L	25 mg/L	50 mg/L	75 mg/L	100 mg/L
0.00	0.0	0.5	1.6	0.0	0.0	0.5
4.50	0.0	0.0	1.6	0.0	0.0	0.0
21.50	0.0	0.0	1.6	0.0	0.0	0.0
25.00	0.0	0.0	1.6	0.0	0.0	0.0
29.50	0.0	0.0	1.6	0.0	0.0	0.5
45.25	0.0	2.1	2.7	1.0	0.0	3.2
48.50	0.0	2.7	4.3	3.2	0.5	4.9
52.50	0.0	3.2	5.4	4.9	2.1	7.1
69.50	0.0	4.9	6.0	8.2	8.2	12.0
72.92	0.0	7.6	9.8	9.8	10.9	14.7
140.25	0.0	10.6	19.7	24.1	25.2	31.2
149.00	0.0	11.5	20.2	25.7	26.8	32.8
166.50	0.0	12.0	19.1	27.9	29.5	35.0
189.75	0.0	12.5	21.3	31.2	33.4	38.3
198.50	0.0	13.5	20.8	31.2	33.9	38.9
214.25	0.0	13.1	23.5	34.5	36.7	42.7
237.25	0.0	13.1	22.4	35.6	36.7	43.2
309.50	0.0	14.7	25.2	37.8	37.8	44.3
335.50	0.0	15.3	25.7	37.8	38.3	43.8

Tabla IV. 19.- Ensayo respirométrico de biodegradación para el tensioactivo GCP 600.

Influencia de la concentración

TENSIOACTIVO: GCP 600						
MÉTODO DE ENSAYO: Respirometría manométrica						
MÉTODO DE ANÁLISIS: DBO						
Identificación: RM2						
Condiciones del ensayo: 25 °C, Oscuridad, Agitación						
Tiempo, h	D.B.O., mgO₂/l					
	Blanco	Conc. Inicial: 15 mg/L	Conc. Inicial: 25 mg/L	Conc. Inicial: 50 mg/L	Conc. Inicial: 75 mg/L	Conc. Inicial: 100 mg/L
	0.00	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
5.00	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
22.00	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
25.75	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
29.50	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
45.75	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
70.00	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
93.75	0.0	0.0	0.0	0.0	2.1	0.0
96.50	0.0	0.0	0.0	0.0	2.7	0.0
119.50	0.0	0.0	0.0	0.0	6.0	2.7
121.50	0.0	0.0	0.0	0.0	6.0	2.7
165.75	0.0	0.0	1.6	4.3	10.9	8.2
168.50	0.0	0.0	1.6	4.3	10.9	8.2
170.50	0.0	0.0	1.6	4.3	11.5	8.2
173.50	0.0	0.0	1.6	4.3	11.5	8.7
176.00	0.0	0.0	2.1	4.9	11.5	8.7
190.00	0.0	0.0	2.1	5.4	12.0	9.3
194.50	0.0	0.0	2.1	5.4	12.0	9.3
197.25	0.0	0.0	2.1	5.4	12.0	9.3
197.50	0.0	0.0	2.7	5.4	12.0	9.3
214.00	0.0	0.0	2.7	6.0	12.6	9.8
222.67	0.0	0.0	2.7	6.0	12.6	9.8
238.00	0.0	0.0	2.7	6.0	12.6	9.8
245.50	0.0	0.0	2.7	6.0	12.6	9.8
248.00	0.0	0.0	2.7	6.5	12.6	9.8
262.50	0.0	0.0	2.7	6.5	13.1	10.4
264.50	0.0	0.0	2.7	6.5	13.1	10.4
334.00	0.0	0.0	3.2	7.6	13.1	10.9
343.00	0.0	0.0	3.2	7.6	13.7	10.9
358.00	0.0	0.0	3.8	7.6	13.7	11.5
382.00	0.0	0.0	3.8	8.2	14.2	11.5
406.25	0.0	0.5	3.8	8.2	14.2	11.5
432.25	0.0	0.5	4.3	8.7	14.7	11.5

Tabla IV. 20.- Ensayo respirométrico de biodegradación para el tensioactivo GCP 650

TENSIOACTIVO: GCP 650 MÉTODO DE ENSAYO: Respirometría manométrica MÉTODO DE ANÁLISIS: DBO Identificación: RM3 Condiciones del ensayo: 25 °C, Oscuridad, Agitación		
Tiempo, h	D.B.O., mgO ₂ /l	
	Blanco	Conc. Inicial: 50 mg/L
0.75	0.0	0.0
2.25	0.0	0.0
21.33	0.0	0.0
46.00	0.0	0.0
53.33	0.0	0.0
70.00	0.0	0.0
96.00	0.0	0.0
141.33	0.0	0.0
146.67	0.0	0.0
152.00	0.0	0.0
166.08	0.0	0.0
177.17	0.0	0.0
189.83	0.0	0.0
193.33	0.0	0.5
213.33	0.0	0.5
215.75	0.0	1.0
218.00	0.0	2.0
221.00	0.0	2.1
237.75	0.0	2.5
311.83	0.0	3.8
336.83	0.0	4.3
478.00	0.0	4.3

4.1.4. BIODEGRADABILIDAD DEL LAS

En la Tabla IV. 21 se muestran los resultados experimentales obtenidos durante el ensayo estático de biodegradación para el LAS. El análisis del tensioactivo se ha realizado por el método de análisis simplificado para determinación de sustancias activas al azul de metileno. Para analizar el efecto de la concentración los experimentos se realizaron a concentraciones iniciales de tensioactivo de 5, 25 y 50 mg/L.

Tabla IV. 21.- Ensayo estático de biodegradación para el LAS. Método de análisis simplificado para determinación de sustancias activas al azul de metileno. Influencia de la concentración

TENSIOACTIVO: LAS ENSAYO DE BIODEGRADACIÓN: Estático MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN: Método de Análisis Simplificado para Determinación de Sustancias Activas al Azul de Metileno MEDIDA DE LA BIOMASA: Recuento de UFC Identificación: L1, L2, L3 Condiciones del ensayo: 25 °C, Oscuridad, Agitación orbital								
Conc. inicial: 5 mg/L			Conc. inicial: 25 mg/L			Conc. inicial: 50 mg/L		
Tiempo, h	Conc., mg/L	Biomasa, UFC/ml	Tiempo, h	Conc., mg/L	Biomasa, UFC/ml	Tiempo, h	Conc., mg/L	Biomasa, UFC/ml
0.00	4.48	1512..500	0.00	29.83	1600	0.00	44.33	72
5.70	4.27	1422.500	4.50	27.89	15550	6.50	46.31	--
21.92	4.48	1977.500	20.50	27.38	22200	26.50	--	200
25.20	4.51	--	28.50	25.15	33.325	31.00	52.71	1700
29.50	4.51	3180	46.50	23.80	13850	46.50	42.11	78000
46.20	4.30	7650	53.00	23.40	176000	54.50	--	110500
53.75	3.88	7000	70.50	22.40	2800	78.75	39.61	245250
70.00	3.16	7000	93.50	22.26	103500	95.25	36.13	305500
94.50	1.17	30000	166.50	7.79	835000	167.50	41.94	--
166.25	0.19	18000	189.50	5.54	2705000	198.50	38.94	715500
189.75	0.15	3500	213.50	5.85	2970000	215.50	34.51	--
213.80	0.05	4000	237.50	4.12	1657500	264.50	21.54	--
238.25	0.12	5000	334.50	1.42	--	342.75	13.75	720250
262.25	0.11	--				359.50	9.32	364250
336.75	0.05	--				408.00	9.01	--

4.1.5. BIODEGRADABILIDAD DE MEZCLAS DE ALCOHOLES GRASOS ETOXILADOS Y ALQUILPOLIGLUCÓSIDOS

En la Tabla IV. 22 se muestran los resultados experimentales obtenidos durante el ensayo estático de biodegradación para las mezclas tensioactivas Findet 1214N/23 y GCP 650 a las concentraciones iniciales de 10 mg/L+10 mg/L y 15 mg/L+5 mg/L respectivamente. El análisis de la concentración de tensioactivo se ha realizado únicamente por el método del yodo-yoduro.

Tabla IV. 22.- Ensayo estático de biodegradación para mezclas tensioactivas de AGE y APG. Método del yodo-yoduro. Influencia de la concentración

TENSIOACTIVOS: FINDET 1214N/23 y GCP 650 ENSAYO DE BIODEGRADACIÓN: Estático MÉDIDA DE LA CONCENTRACIÓN: Método del yodo-yoduro MEDIDA DE LA BIOMASA: Recuento de UFC Identificación: M1, M2 Condiciones del ensayo: 25 °C, Oscuridad, Agitación orbital					
Concentración inicial: FINDET 1214N/23: 10 mg/L GCP 650: 10 mg/L			Concentración inicial: FINDET 1214N/23: 15 mg/L GCP 650: 5 mg/L		
Tiempo, h	Conc., mg/L	Biomasa, UFC/ml	Tiempo, h	Conc., mg/L	Biomasa, UFC/ml
0.00	8.534	2100	0.00	13.343	120
6.50	8.876	2597.5	2.00	12.804	--
22.75	8.514	446500	6.50	13.366	395
33.00	1.086	4410000	22.75	13.670	--
46.50	1.173	7080000	30.50	13.410	462500
54.00	1.138	--	47.00	7.986	316500
71.00	0.711	--	54.75	3.545	779750
73.00	--	3790000	71.00	1.639	1830000
142.75	0.553	2610000	95.75	1.688	3740000
167.50	0.464	3885000	167.75	1.324	2895000
190.75	0.598	2025000	190.75	1.516	2493334
			215.00	1.045	395000

4.2. TOXICIDAD DE TENSIOACTIVOS

Para determinar la toxicidad de los tensioactivos ensayados se determinó la inhibición de la luminiscencia emitida por las bacterias marinas luminiscentes de la cepa *Vibrio fischeri* en contacto con el tóxico. Los experimentos se realizaron con concentraciones de tensioactivo variables, de 5 a 500 mg/L, para permitir una medida correcta de la intensidad luminosa.

En la Tabla IV. 23 a Tabla IV. 28 se presentan los resultados de toxicidad para los alcoholes grasos etoxilados: Findet 10/15, Findet 10/18, Findet 1618A/18, Findet 1618A/23, Findet 1214N/16 y Findet 1214N/23.

En la Tabla IV. 29 a Tabla IV. 31 se presentan los resultados para el ácido graso Findet AR/52, NPEO y LAS, respectivamente.

En la Tabla IV. 32 a Tabla IV. 34 se presentan los resultados de inhibición de la luminiscencia para los alquilpoliglucósidos GCP 600, GCP 650 y GCP 215 respectivamente. Finalmente en la Tabla IV. 35 se presentan los resultados de inhibición de la luminiscencia obtenidos para el BEROL LFG 61, mezcla de AGE y APG.

En las tablas se presentan los valores de intensidad luminosa a tiempo cero, tiempo de incubación 15 y 30 minutos, el % de inhibición, la función Gamma y el factor de corrección promedio de la intensidad luminosa.

Tabla IV. 23.- Medida de la inhibición de la luminiscencia de bacterias *Vibrio fischeri* para el tensioactivo Findet 10/15

TENSIOACTIVO: FINDET 10/15 MEDIDA DE LA TOXICIDAD: Determinación de la inhibición mediante LUMIStox ORGANISMO DE PRUEBA: Photobacterium phosphoreum de la cepa <i>Vibrio fischeri</i> Identificación: T1							
Concentración inicial: 100 mg/L							
Tiempo de incubación: 15 min				Tiempo de incubación: 30 min			
Intens, I_0	Intens, I_t	Inhibic, %	$\Gamma_t(c)$	Intens, I_0	Intens, I_t	Inhibic, %	$\Gamma_t(c)$
568.90	682.20	1.10	--	568.90	760.30	-0.32	--
567.60	636.30	7.55	0.079	567.60	720.70	4.69	0.047
572.30	630.70	9.10	0.098	572.30	688.00	9.76	0.106
586.30	567.00	20.25	0.251	586.30	628.40	19.55	0.240
581.70	427.20	39.44	0.647	581.70	480.20	38.04	0.611
598.60	264.50	63.55	1.738	598.60	315.60	60.42	1.522
596.00	139.90	80.64	4.154	596.00	166.10	79.08	3.772
593.80	61.63	91.44	10.658	593.80	75.22	90.49	9.499
600.90	19.86	97.27	35.610	600.90	28.66	96.42	26.885
636.20	1.64	99.79	468.390	636.20	1.65	99.80	511.816
fc= 1.21				fc= 1.33			

Tabla IV. 24.- Medida de la inhibición de la luminiscencia de bacterias *Vibrio fischeri* para el tensioactivo Findet 10/18

TENSIOACTIVO: FINDET 10/18 MEDIDA DE LA TOXICIDAD: Determinación de la inhibición mediante LUMIStox ORGANISMO DE PRUEBA: Photobacterium phosphoreum de la cepa <i>Vibrio fischeri</i> Identificación: T2							
Concentración inicial: 50 mg/L							
Tiempo de incubación: 15 min				Tiempo de incubación: 30 min			
Intens, I_0	Intens, I_t	Inhibic, %	$\Gamma_t(c)$	Intens, I_0	Intens, I_t	Inhibic, %	$\Gamma_t(c)$
640.40	777.60	1.97	--	640.40	878.40	2.59	--
645.20	790.50	1.08	0.012	645.20	895.10	1.48	0.016
653.30	791.30	2.21	0.023	653.30	883.40	3.98	0.042
680.40	789.60	6.31	0.068	680.40	884.90	7.65	0.084
705.20	753.40	13.74	0.160	705.20	853.50	14.06	0.165
705.40	700.90	19.79	0.248	705.40	808.20	18.64	0.230
715.60	578.90	34.69	0.532	715.60	666.90	33.83	0.513
713.50	418.60	52.63	1.113	713.50	500.50	50.19	1.010
722.20	235.70	73.65	2.799	722.20	284.10	72.07	2.584
737.00	110.50	87.90	7.270	737.00	129.30	87.54	7.036
fc= 1.24				fc= 1.41			

Tabla IV. 25.- Medida de la inhibición de la luminiscencia de bacterias *Vibrio fischeri* para el tensioactivo Findet 1618A/18

TENSIOACTIVO: FINDET 1618A/18 MEDIDA DE LA TOXICIDAD: Determinación de la inhibición mediante LUMIStox ORGANISMO DE PRUEBA: Photobacterium phosphoreum de la cepa <i>Vibrio fischeri</i> Identificación: T3							
Concentración inicial: 100 mg/L							
Tiempo de incubación: 15 min				Tiempo de incubación: 30 min			
Intens, I_0	Intens, I_t	Inhibic, %	$\Gamma_t(c)$	Intens, I_0	Intens, I_t	Inhibic, %	$\Gamma_t(c)$
150.40	199.70	0.43	--	150.40	218.30	0.22	--
145.60	193.60	0.31	0.000	145.60	218.70	-3.27	-0.034
148.50	197.10	0.49	0.002	148.50	214.70	0.63	0.002
155.90	196.60	5.44	0.054	155.90	216.70	4.46	0.043
152.40	187.80	7.63	0.079	152.40	201.70	9.04	0.095
156.70	190.90	8.67	0.091	156.70	208.60	8.50	0.089
160.90	181.70	15.31	0.177	160.90	201.70	13.81	0.156
160.20	171.90	19.55	0.239	160.20	186.70	19.87	0.244
165.10	169.80	22.90	0.293	165.10	179.00	25.47	0.337
165.00	133.70	39.24	0.641	165.00	135.90	43.36	0.760
fc= 1.33				fc= 1.45			

Tabla IV. 26.- Medida de la inhibición de la luminiscencia de bacterias *Vibrio fischeri* para el tensioactivo Findet 1618A/23

TENSIOACTIVO: FINDET 1618A/23 MEDIDA DE LA TOXICIDAD: Determinación de la inhibición mediante LUMIStox ORGANISMO DE PRUEBA: Photobacterium phosphoreum de la cepa <i>Vibrio fischeri</i> Identificación: T4							
Concentración inicial: 50 mg/L							
Tiempo de incubación: 15 min				Tiempo de incubación: 30 min			
Intens, I_0	Intens, I_t	Inhibic, %	$\Gamma_t(c)$	Intens, I_0	Intens, I_t	Inhibic, %	$\Gamma_t(c)$
268.00	335.10	-3.68	--	268.00	356.50	-1.68	--
262.60	317.90	-0.38	-0.000	262.60	353.60	-2.93	-0.027
276.20	323.80	2.78	0.032	276.20	352.60	2.42	0.026
273.20	322.50	2.13	0.025	273.20	346.70	3.02	0.032
282.00	331.00	2.67	0.030	282.00	348.50	5.52	0.060
283.10	324.20	5.06	0.056	283.10	347.80	6.11	0.066
287.40	300.80	13.24	0.156	287.40	324.40	13.75	0.160
283.60	270.40	20.93	0.269	283.60	287.50	22.52	0.292
290.70	258.60	26.25	0.360	290.70	271.50	28.62	0.402
294.30	209.30	41.03	0.701	294.30	212.20	44.90	0.816
fc= 1.20				fc= 1.30			

Tabla IV. 27.- Medida de la inhibición de la luminiscencia de bacterias *Vibrio fischeri* para el tensioactivo Findet 1214N/16

TENSIOACTIVO: FINDET 1214N/16 MEDIDA DE LA TOXICIDAD: Determinación de la inhibición mediante LUMIStox ORGANISMO DE PRUEBA: Photobacterium phosphoreum de la cepa <i>Vibrio fischeri</i> Identificación: T5							
Concentración inicial: 100 mg/L							
Tiempo de incubación: 15 min				Tiempo de incubación: 30 min			
Intens, I_0	Intens, I_t	Inhibic, %	$\Gamma_t(c)$	Intens, I_0	Intens, I_t	Inhibic, %	$\Gamma_t(c)$
202.50	310.80	0.53	--	202.50	351.00	0.71	--
207.30	301.60	5.68	0.058	207.30	352.30	2.62	0.029
196.80	216.20	28.79	0.401	196.80	259.10	24.60	0.329
215.70	221.40	33.47	0.500	215.70	266.00	29.34	0.419
215.80	117.10	64.83	1.838	215.80	141.20	62.53	1.674
218.30	66.33	80.30	4.068	218.30	82.81	78.27	3.613
219.20	34.53	89.79	8.776	219.20	43.28	88.69	7.863
221.10	12.39	96.37	26.481	221.10	15.91	95.88	23.319
227.60	7.73	97.80	44.343	227.60	8.42	97.88	46.304
241.60	4.01	98.92	91.784	241.60	4.03	99.04	103.910
fc= 1.54				fc= 1.75			

Tabla IV. 28.- Medida de la inhibición de la luminiscencia de bacterias *Vibrio fischeri* para el tensioactivo Findet 1214N/23

TENSIOACTIVO: FINDET 1214N/23							
MEDIDA DE LA TOXICIDAD: Determinación de la inhibición mediante LUMIStox							
ORGANISMO DE PRUEBA: Photobacterium phosphoreum de la cepa <i>Vibrio fischeri</i>							
Identificación: T6							
Concentración inicial: 50 mg/L							
Tiempo de incubación: 15 min				Tiempo de incubación: 30 min			
Intens, I₀	Intens, I_t	Inhibic, %	Γ_t(c)	Intens, I₀	Intens, I_t	Inhibic, %	Γ_t(c)
686.60	704.70	2.09	0.023	686.60	766.50	2.12	0.021
657.00	741.80	-7.70	-0.070	657.00	804.90	-7.41	-0.069
689.00	767.50	-6.25	-0.057	689.00	831.30	-5.78	-0.055
694.70	734.80	-0.90	-0.007	694.70	789.00	0.41	0.003
713.20	772.90	-3.37	-0.031	713.20	832.20	-2.30	-0.023
739.20	801.60	-3.44	-0.031	739.20	848.80	-0.68	-0.007
735.30	711.20	7.75	0.085	735.30	751.40	10.41	0.115
686.80	548.90	23.77	0.313	686.80	612.50	21.81	0.278
725.00	374.70	55.71	1.031	725.00	439.10	46.90	0.882
775.10	189.70	76.65	3.290	775.10	215.70	75.60	3.096
fc= 1.05				fc= 1.14			

Tabla IV. 29.- Medida de la inhibición de la luminiscencia de bacterias *Vibrio fischeri* para el tensioactivo Findet AR/52

TENSIOACTIVO: FINDET AR/52							
MEDIDA DE LA TOXICIDAD: Determinación de la inhibición mediante LUMISTox							
ORGANISMO DE PRUEBA: Photobacterium phosphoreum de la cepa <i>Vibrio fischeri</i>							
Identificación: T7							
Concentración inicial: 100 mg/L							
Tiempo de incubación: 15 min				Tiempo de incubación: 30 min			
Intens, I₀	Intens, I_t	Inhibic, %	Γ_t(c)	Intens, I₀	Intens, I_t	Inhibic, %	Γ_t(c)
230.50	315.20	0.74	0.009	230.50	344.10	-0.19	-0.001
231.00	322.40	-1.30	-0.011	231.00	339.30	1.45	0.014
234.70	318.70	1.42	0.016	234.70	343.70	1.71	0.017
240.00	319.60	3.31	0.036	240.00	334.60	6.42	0.068
245.50	316.30	6.48	0.071	245.50	339.10	7.33	0.078
251.10	315.60	8.77	0.098	251.10	331.50	11.40	0.128
245.30	302.00	10.63	0.120	245.30	317.50	13.14	0.151
248.40	287.00	16.13	0.194	248.40	303.70	17.95	0.218
249.60	265.80	22.70	0.295	249.60	285.50	23.24	0.302
257.50	198.30	44.10	0.792	257.50	214.70	44.05	0.787
fc= 1.38				fc= 1.49			

Tabla IV. 30.- Medida de la inhibición de la luminiscencia de bacterias *Vibrio fischeri* para el tensioactivo NPEO

TENSIOACTIVO: NONILFENOL POLIETOXILADO							
MEDIDA DE LA TOXICIDAD: Determinación de la inhibición mediante LUMIStox							
ORGANISMO DE PRUEBA: Photobacterium phosphoreum de la cepa <i>Vibrio fischeri</i>							
Identificación: T8							
Concentración inicial: 500 mg/L							
Tiempo de incubación: 15 min				Tiempo de incubación: 30 min			
Intens, I₀	Intens, I_t	Inhibic, %	Γ_t(c)	Intens, I₀	Intens, I_t	Inhibic, %	Γ_t(c)
841.40	1156.00	000	--	841.40	1215.00	0.00	--
842.20	1190.00	-2.84	-0.028	842.20	1247.00	-2.54	-0.025
868.80	1179.00	1.23	0.012	868.80	1252.00	0.20	0.002
873.70	1162.00	3.20	0.033	873.70	1236.00	2.03	0.021
854.80	1116.00	4.97	0.052	854.80	1176.00	4.73	0.050
874.20	1074.00	10.58	0.118	874.20	1147.00	9.14	0.101
936.40	988.00	23.20	0.302	936.40	1036.00	23.38	0.305
861.50	813.60	31.26	0.455	861.50	832.90	33.05	0.494
884.60	780.00	35.82	0.558	884.60	825.60	35.37	0.547
895.70	576.60	53.14	1.134	895.70	568.60	56.04	1.275
fc= 1.37				fc= 1.44			

Tabla IV. 31.- Medida de la inhibición de la luminiscencia de bacterias *Vibrio fischeri* para el LAS

TENSIOACTIVO: LAS							
MEDIDA DE LA TOXICIDAD: Determinación de la inhibición mediante LUMIStox							
ORGANISMO DE PRUEBA: Photobacterium phosphoreum de la cepa <i>Vibrio fischeri</i>							
Identificación: T9							
Concentración inicial: 100 mg/L							
Tiempo de incubación: 15 min				Tiempo de incubación: 30 min			
Intens, I₀	Intens, I_t	Inhibic, %	Γ_t(c)	Intens, I₀	Intens, I_t	Inhibic, %	Γ_t(c)
1170.00	1208.00	0.00	--	1170.00	1091.00	0.00	--
1174.00	1305.00	-7.66	-0.071	1174.00	1288.00	-17.65	-0.150
1149.00	1296.00	-9.25	-0.085	1149.00	1276.00	-19.09	-0.160
1179.00	1287.00	-5.73	-0.054	1179.00	1240.00	-12.79	-0.113
1174.00	1207.00	0.42	0.004	1174.00	1133.00	-3.50	-0.034
1181.00	1178.00	3.39	0.035	1181.00	1099.00	0.20	0.002
1156.00	1071.00	10.27	0.114	1156.00	994.90	7.70	0.083
1138.00	870.90	25.88	0.349	1138.00	764.40	27.97	0.388
1171.00	691.00	42.85	0.750	1171.00	579.10	46.97	0.886
1192.00	532.10	56.76	1.313	1192.00	448.70	59.63	1.477
fc= 1.03				fc= 0.93			

Tabla IV. 32.- Medida de la inhibición de la luminiscencia de bacterias *Vibrio fischeri* para el tensioactivo GCP 215

TENSIOACTIVO: GCP 215 MEDIDA DE LA TOXICIDAD: Determinación de la inhibición mediante LUMIStox ORGANISMO DE PRUEBA: Photobacterium phosphoreum de la cepa <i>Vibrio fischeri</i> Identificación: T10							
Concentración inicial: 100 mg/L							
Tiempo de incubación: 15 min				Tiempo de incubación: 30 min			
Intens, I_0	Intens, I_t	Inhibic, %	$\Gamma_t(c)$	Intens, I_0	Intens, I_t	Inhibic, %	$\Gamma_t(c)$
736.00	757.80	0.00	--	736.50	767.70	0.00	--
744.00	818.50	-6.92	-0.065	744.00	836.00	-7.80	-0.072
762.00	816.30	-4.11	-0.040	762.00	797.20	-0.37	-0.004
773.80	807.40	-1.41	-0.014	773.80	811.50	-0.61	-0.006
775.40	789.70	1.02	0.010	775.40	774.20	4.21	0.044
755.30	740.80	4.68	0.049	755.30	711.70	9.60	0.106
734.10	647.20	14.32	0.167	734.10	602.60	21.25	0.270
733.40	596.60	20.94	0.265	733.40	573.70	24.95	0.333
768.90	459.30	41.94	0.722	768.90	441.40	44.93	0.816
770.90	299.90	62.19	1.645	770.90	276.30	65.62	1.908
fc= 1.02				fc= 1.04			

Tabla IV. 33.- Medida de la inhibición de la luminiscencia de bacterias *Vibrio fischeri* para el tensioactivo GCP 600

TENSIOACTIVO: GCP 600 MEDIDA DE LA TOXICIDAD: Determinación de la inhibición mediante LUMIStox ORGANISMO DE PRUEBA: Photobacterium phosphoreum de la cepa <i>Vibrio fischeri</i> Identificación: T11							
Concentración inicial: 100 mg/L							
Tiempo de incubación: 15 min				Tiempo de incubación: 30 min			
Intens, I_0	Intens, I_t	Inhibic, %	$\Gamma_t(c)$	Intens, I_0	Intens, I_t	Inhibic, %	$\Gamma_t(c)$
1036.00	1218.00	0.17	0.003	1036.00	1330.00	-0.60	-0.002
1038.00	1234.00	-0.95	-0.007	1038.00	1320.00	0.29	0.006
1032.00	1214.00	0.12	0.003	1032.00	1321.00	-0.33	0.000
1040.00	1234.00	-0.72	-0.005	1040.00	1336.00	-0.65	-0.003
1028.00	1187.00	1.99	0.021	1028.00	1277.00	2.64	0.030
1058.00	1149.00	7.73	0.086	1058.00	1258.00	6.76	0.076
1053.00	1003.00	19.08	0.238	1053.00	1094.00	18.58	0.232
1027.00	742.00	38.64	0.633	1027.00	847.70	35.30	0.550
1040.00	650.90	46.88	0.885	1040.00	757.80	42.93	0.756
1070.00	231.60	81.62	4.451	1070.00	248.90	81.77	4.502
fc= 1.18				fc= 1.28			

Tabla IV. 34.- Medida de la inhibición de la luminiscencia de bacterias *Vibrio fischeri* para el tensioactivo GCP 650

TENSIOACTIVO: GCP 650 MEDIDA DE LA TOXICIDAD: Determinación de la inhibición mediante LUMIStox ORGANISMO DE PRUEBA: Photobacterium phosphoreum de la cepa <i>Vibrio fischeri</i> Identificación: T12							
Concentración inicial: 100 mg/L							
Tiempo de incubación: 15 min				Tiempo de incubación: 30 min			
Intens, I ₀	Intens, I _t	Inhibic, %	Γ _t (c)	Intens, I ₀	Intens, I _t	Inhibic, %	Γ _t (c)
1320.00	1444.00	0,00	--	1320.00	1554.00	0.00	--
1364.00	1439.00	3.56	0.037	1364.00	1525.00	5.03	0.053
1324.00	1397.00	3.55	0.037	1324.00	1493.00	4.22	0.044
1345.00	1400.00	4.85	0.051	1345.00	1515.00	4.32	0.045
1355.00	1376.00	7.17	0.077	1355.00	1479.00	7.28	0.079
1345.00	1224.00	16.81	0.202	1345.00	1333.00	15.82	0.188
1310.00	1000.00	30.22	0.433	1310.00	1084.00	29.71	0.423
1330.00	799.60	45.04	0.820	1330.00	867.50	44.60	0.805
1305.00	502.60	64.79	1.840	1305.00	582.20	62.10	1.639
1376.00	287.70	80.89	4.232	1376.00	313.20	80.67	4.172
fc= 1.09				fc= 1.17			

Tabla IV. 35.- Medida de la inhibición de la luminiscencia de bacterias *Vibrio fischeri* para el tensioactivo BEROL LFG 61

TENSIOACTIVO: BEROL LFG 61							
MEDIDA DE LA TOXICIDAD: Determinación de la inhibición mediante LUMIStox							
ORGANISMO DE PRUEBA: Photobacterium phosphoreum de la cepa <i>Vibrio fischeri</i>							
Identificación: T13							
Concentración inicial: 100 mg/L							
Tiempo de incubación: 15 min				Tiempo de incubación: 30 min			
Intens, I₀	Intens, I_t	Inhibic, %	Γ_t(c)	Intens, I₀	Intens, I_t	Inhibic, %	Γ_t(c)
1127.00	1185.00	0.00	--	1127.00	1135.00	0.00	--
1170.00	1287.00	-4.62	-0.044	1170.00	1283.00	-8.89	-0.082
1184.00	1198.00	3.77	0.039	1184.00	1204.00	-0.97	-0.010
1181.00	1324.00	-6.62	-0.062	1181.00	1380.00	-16.03	-0.138
1204.00	1312.00	-3.64	-0.035	1204.00	1352.00	-11.50	-0.103
1190.00	1226.00	2.02	0.021	1190.00	1271.00	-6.05	-0.057
1142.00	1129.00	5.98	0.064	1142.00	1158.00	-0.69	-0.007
1158.00	1037.00	14.83	0.174	1158.00	1069.00	8.34	0.091
1187.00	876.10	29.80	0.425	1187.00	939.90	21.38	0.272
1203.00	638.80	49.50	0.980	1203.00	662.10	45.35	0.830
fc= 1.05				fc= 1.007			

4.3. TOXICIDAD DE TENSIOACTIVOS DURANTE EL PROCESO DE BIODEGRADACIÓN

Para determinar la toxicidad de los tensioactivos durante el ensayo estático de biodegradabilidad se determinó la inhibición de la luminiscencia emitida por las bacterias marinas luminiscentes de la cepa *Vibrio fischeri* en contacto con el tóxico, en función del tiempo de duración del ensayo.

En la Tabla IV. 36 a Tabla IV. 33 se presentan los resultados de toxicidad para los alcoholes grasos etoxilados: Findet 1618A/18, Findet 1618A/23, Findet 1214N/16 y Findet 1214N/23 a concentraciones comprendidas entre 5 y 50 mg/L.

En la Tabla IV. 44 a Tabla IV. 46 se presentan los resultados correspondientes para el NPEO a las concentraciones iniciales de ensayo de 5, 25 y 50 mg/L.

En la Tabla IV. 47 a Tabla IV. 49 se presentan los resultados de inhibición de la luminiscencia durante el ensayo de biodegradabilidad para los alquilpoliglucósidos GCP 215, GCP 600 y GCP 650 respectivamente a concentraciones iniciales de ensayo entre 12 y 100 mg/L.

En la Tabla IV. 50 y Tabla IV. 51 se muestran los resultados correspondientes al LAS para concentraciones iniciales de ensayo de 25 y 50 mg/L

Finalmente en la Tabla IV. 52 y Tabla IV. 53 se presentan los resultados de inhibición de la luminiscencia obtenidos para las mezclas tensioactivas de AGE y APG.

En las tablas se presentan los valores de intensidad luminosa a tiempo cero, tiempo de incubación 15 y 30 minutos, el factor de corrección promedio de la intensidad luminosa y el % de inhibición.

Tabla IV. 36.- Medida de la toxicidad durante el proceso de biodegradación para el tensioactivo Findet 1618A/18 a 50 mg/L

TENSIOACTIVO: FINDET 1618A/18 ENSAYO DE BIODEGRADACIÓN: Estático MEDIDA DE LA TOXICIDAD: Determinación del porcentaje de inhibición Identificación: TB1 Condiciones del ensayo: 25 °C, Oscuridad, Agitación orbital						
Concentración inicial: 50 mg/L						
Tiempo de incubación: 15 min						
t, días	I₀ blanco	I_t blanco	I₀ muestra	I_t muestra	f_k	% Inhibición
0.000	1002.00	1074.00	1001.00	904.70	1.071	15.679
15.000	974.70	281.30	1030.00	890.20	0.288	--
23.000	972.60	892.30	902.80	725.70	0.917	12.382
39.500	960.20	904.60	863.10	692.90	0.942	14..785
70.500	2116.00	2342.00	2033.00	1928.00	1.098	13.652
87.500	2140.00	2308.00	2052.00	1901.00	1.078	14.102
159.500	1651.00	2058.00	1698.00	2068.00	1.246	2.295
184.200	1649.00	1882.00	1687.00	2011.00	1.141	--

Tabla IV. 37.- Medida de la toxicidad durante el proceso de biodegradación para el tensioactivo Findet 1618A/23 a 5 mg/L

TENSIOACTIVO: FINDET 1618A/23 ENSAYO DE BIODEGRADACIÓN: Estático MEDIDA DE LA TOXICIDAD: Determinación del porcentaje de inhibición Identificación: TB2 Condiciones del ensayo: 25 °C, Oscuridad, Agitación orbital						
Concentración inicial: 5 mg/L						
Tiempo de incubación: 15 min						
t, horas	I ₀ blanco	I _t blanco	I ₀ muestra	I _t muestra	f _k	% Inhibición
0.000	821.60	911.20	819.30	757.90	1.109	36.620
8.000	805.50	936.10	816.60	683.00	1.162	28.029
22.500	1272.00	1135.00	1154.00	936.20	0.892	--
31.250	1266.00	1169.00	1175.00	883.40	0.923	18.578
47.000	1091.00	1195.00	1145.00	1186.00	1.095	--
56.000	1141.00	1063.00	1106.00	1240.00	0.931	--
71.000	1275.00	1382.00	1292.00	1178.00	1.083	15.882
79.750	1240.00	1407.00	1310.00	1374.00	1.134	7.563
98.000	982.00	1217.00	1036.00	1051.00	1.239	--
143.000	1012.00	283.40	1028.00	264.00	0.280	8.156
167.500	1042.00	1050.00	1034.00	1049.00	1.007	--
191.500	1055.00	1184.00	1124.00	1212.00	1.122	3.919
215.000	410.00	495.10	420.10	491.00	1.206	3.117
239.500	108.10	540.50	407.80	496.00	1.324	8.054

Tabla IV. 38.- Medida de la toxicidad durante el proceso de biodegradación para el tensioactivo Findet 1214N/16 a 5 mg/L

TENSIOACTIVO: FINDET 1214N/16 ENSAYO DE BIODEGRADACIÓN: Estático MEDIDA DE LA TOXICIDAD: Determinación del porcentaje de inhibición Identificación: TB3 Condiciones del ensayo: 25 °C, Oscuridad, Agitación orbital						
Concentración inicial: 5 mg/L						
Tiempo de incubación: 15 min						
t, horas	I ₀ blanco	I _t blanco	I ₀ muestra	I _t muestra	f _k	% Inhibición
0.000	442.10	460.2	473.20	474.60	1.040	3.648
14.500	440.70	465.60	476.20	379.90	1.056	24.489
22.500	771.70	158.00	774.30	733.40	0.204	--
38.500	769.50	732.20	766.00	719.20	0.951	1.326
62.500	1110.00	977.40	1099.00	927.50	0.880	4.155
86.500	2087.00	1723.00	1107.00	919.20	0.825	0.000

Tabla IV. 39.- Medida de la toxicidad durante el proceso de biodegradación para el tensioactivo Findet 1214N/16 a 25 mg/L

TENSIOACTIVO: FINDET 1214N/16 ENSAYO DE BIODEGRADACIÓN: Estático MEDIDA DE LA TOXICIDAD: Determinación del porcentaje de inhibición Identificación: TB4 Condiciones del ensayo: 25 °C, Oscuridad, Agitación orbital						
Concentración inicial: 25 mg/L						
Tiempo de incubación: 15 min						
t, horas	I ₀ blanco	I _t blanco	I ₀ muestra	I _t muestra	f _k	% Inhibición
0.000	--	--	--	--	--	--
47.000	960.50	1159.00	1121.00	887.40	1.206	34.396
64.000	1112.00	1305.00	1110.00	1077.00	1.173	17.322
71.000	1172.00	1237.00	1213.00	1118.00	1.055	12.674
87.500	1250.00	1325.00	1216.00	1079.00	1.060	16.289
159.500	2278.00	2376.00	2338.00	2394.00	1.043	1.828
185.000	2338.00	2462.00	2318.00	2423.00	1.053	0.734
209.500	2738.00	2461.00	2564.00	2251.00	0.898	2.325

Tabla IV. 40.- Medida de la toxicidad durante el proceso de biodegradación para el tensioactivo Findet 1214N/23 a 15 mg/L

TENSIOACTIVO: FINDET 1214N/23 ENSAYO DE BIODEGRADACIÓN: Estático MEDIDA DE LA TOXICIDAD: Determinación del porcentaje de inhibición Identificación: TB5 Condiciones del ensayo: 25 °C, Oscuridad, Agitación orbital						
Concentración inicial: 15 mg/L						
Tiempo de incubación: 15 min						
t, horas	I ₀ blanco	I _t blanco	I ₀ muestra	I _t muestra	f _k	% Inhibición
0.000	1313.00	1793.00	1303.00	1526.00	1.365	14.238
15.000	1355.00	1828.00	1373.00	1497.00	1.349	19.180
23.250	1800.00	688.60	1842.00	1737.00	0.382	--
39.000	1831.00	1233.00	1887.00	2194.00	0.673	--
63.500	1164.00	1768.00	1289.00	1882.00	1.518	3.874
87.500	1128.00	1645.00	1249.00	1721.00	1.458	5.515

Tabla IV. 41.- Medida de la toxicidad durante el proceso de biodegradación para el tensioactivo Findet 1214N/23 a 20 mg/L

TENSIOACTIVO: FINDET 1214N/23 ENSAYO DE BIODEGRADACIÓN: Estático MEDIDA DE LA TOXICIDAD: Determinación del porcentaje de inhibición Identificación: TB6 Condiciones del ensayo: 25 °C, Oscuridad, Agitación orbital						
Concentración inicial: 20 mg/L						
Tiempo de incubación: 15 min						
t, horas	I ₀ blanco	I _t blanco	I ₀ muestra	I _t muestra	f _k	% Inhibición
6.500	421.90	609.10	420.95	234.00	1.443	61.415
54.500	412.10	481.90	407.30	428.40	1.169	10.055
78.750	412.10	481.90	398.70	417.10	1.169	10.537
95.250	1100.00	1350.00	1086.00	1309.00	1.227	1.787
167.500	1100.00	1350.00	1148.00	1381.00	1.227	1.980
198.500	1100.00	1350.00	1111.50	1350.50	1.227	0.999

Tabla IV. 42.- Medida de la toxicidad durante el proceso de biodegradación para el tensioactivo Findet 1214N/23 a 25 mg/L

TENSIOACTIVO: FINDET 1214N/23 ENSAYO DE BIODEGRADACIÓN: Estático MEDIDA DE LA TOXICIDAD: Determinación del porcentaje de inhibición Identificación: TB7 Condiciones del ensayo: 25 °C, Oscuridad, Agitación orbital						
Concentración inicial: 25 mg/L						
Tiempo de incubación: 15 min						
t, horas	I₀ blanco	I_t blanco	I₀ muestra	I_t muestra	f_k	% Inhibición
0.000	1271.00	1487.00	1268.00	755.60	1.169	49.066
15.000	1368.00	1428.00	1386.00	878.10	1.043	39.306
24.250	1383.00	1450.00	1408.00	1003.00	1.048	32.055
51.250	1447.00	1462.00	1473.00	1014.00	1.010	31.867
60.250	1490.00	1551.00	1504.00	1139.00	1.040	27.247
75.250	1385.00	1609.00	1470.00	1735.00	1.161	--

Tabla IV. 43.- Medida de la toxicidad durante el proceso de biodegradación para el tensioactivo Findet 1214N/23 a 50 mg/L

TENSIOACTIVO: FINDET 1214N/23 ENSAYO DE BIODEGRADACIÓN: Estático MEDIDA DE LA TOXICIDAD: Determinación del porcentaje de inhibición Identificación: TB8 Condiciones del ensayo: 25 °C, Oscuridad, Agitación orbital						
Concentración inicial: 50 mg/L						
Tiempo de incubación: 15 min						
t, horas	I ₀ blanco	I _t blanco	I ₀ muestra	I _t muestra	f _k	% Inhibición
0.000	1826.00	2316.00	1855.00	1157.00	1.268	50.82
16.000	1830.00	2430.00	2054.00	874.40	1.327	67.94
23.750	2520.00	2530.00	2583.00	2292.00	1.003	--
39.750	2520.00	2347.00	2446.00	2184.00	0.938	--
49.000	1339.00	1843.00	1467.00	1643.00	1.376	18.63
65.000	1399.00	1910.00	1483.00	1755.00	1.365	--
92.000	1249.00	1524.00	1163.00	1205.00	1.220	15.08
160.000	1230.00	1552.00	1260.00	1443.00	1.261	9.23
184.000	1486.00	1942.00	1621.00	1929.00	1.306	8.94
209.000	1561.00	1015.00	1656.00	1974.00	0.650	--
232.000	2130.00	1561.00	2130.00	1709.00	0.732	--
305.000	2110.00	2290.00	2226.00	2376.00	1.085	1.65

Tabla IV. 44.- Medida de la toxicidad durante el proceso de biodegradación para el tensioactivo NPEO a 5 mg/L

TENSIOACTIVO: NONILFENOL ENSAYO DE BIODEGRADACIÓN: Estático MEDIDA DE LA TOXICIDAD: Determinación del porcentaje de inhibición Identificación: TB9 Condiciones del ensayo: 25 °C, Oscuridad, Agitación orbital						
Concentración inicial: 5 mg/L						
Tiempo de incubación: 15 min						
t, horas	I₀ blanco	I_t blanco	I₀ muestra	I_t muestra	f_k	% Inhibición
0.000	454.40	517.60	379.40	442.80	1.139	0.00
14.500	419.30	486.90	421.30	517.30	1.161	--
22.500	433.50	457.70	431.30	428.60	1.055	5.88
38.500	436.00	467.30	421.30	432.40	1.071	4.23
62.500	456.60	505.50	435.90	507.00	1.107	0.00
86.500	456.10	513.80	464.40	463.90	1.126	--

Tabla IV. 45.- Medida de la toxicidad durante el proceso de biodegradación para el tensioactivo NPEO a 25 mg/L

TENSIOACTIVO: NONILFENOL ENSAYO DE BIODEGRADACIÓN: Estático MEDIDA DE LA TOXICIDAD: Determinación del porcentaje de inhibición Identificación: TB10 Condiciones del ensayo: 25 °C, Oscuridad, Agitación orbital						
Concentración inicial: 25 mg/L						
Tiempo de incubación: 15 min						
t, horas	I ₀ blanco	I _t blanco	I ₀ muestra	I _t muestra	f _k	% Inhibición
0.000	1434.00	1734.00	1489.00	1730.00	1.209	3.915
16.000	1508.00	1897.00	1568.00	1781.00	1.257	9.707
23.500	1802.00	1905.00	1803.00	1863.00	1.057	--
39.750	1752.00	2036.00	1915.00	1993.00	1.162	10.443
49.000	1505.00	1963.00	1630.00	1784.00	1.304	16.088
65.000	1588.00	1984.00	1652.00	1658.00	1.249	19.668
92.000	2003.00	2167.00	1997.00	1825.00	1.081	15.529
136.500	1975.00	2092.00	2037.00	1841.00	1.059	--
160.000	1823.00	19999.00	1745.00	1440.00	1.096	24.744
184.000	1823.00	2062.00	1797.00	1475.00	1.131	27.432
209.000	1826.00	1499.00	1836.00	1564.00	0.820	--
232.000	1802.00	1983.00	1911.00	1693.00	1.100	19.493

Tabla IV. 46.- Medida de la toxicidad durante el proceso de biodegradación para el tensioactivo NPEO a 50 mg/L

TENSIOACTIVO: NONILFENOL ENSAYO DE BIODEGRADACIÓN: Estático MEDIDA DE LA TOXICIDAD: Determinación del porcentaje de inhibición Identificación: TB11 Condiciones del ensayo: 25 °C, Oscuridad, Agitación orbital						
Concentración inicial: 50 mg/L						
Tiempo de incubación: 15 min						
t, horas	I₀ blanco	I_t blanco	I₀ muestra	I_t muestra	f_k	% Inhibición
0.000	1551.00	1747.00	1617.00	1596.00	1.126	12.372
5.750	1551.00	1747.00	1584.50	1588.50	1.126	10.957
21.500	1551.00	1747.00	1639.00	1586.50	1.126	14.026
29.250	1551.00	1747.00	1598.00	1590.50	1.126	14.430
45.750	1850.00	1867.00	1909.00	1556.00	1.009	19.256
69.750	1850.00	1867.00	1766.50	1380.50	1.009	23.866
189.500	1598.00	1507.00	1574.50	1174.00	0.943	17.632
213,750	1598.00	1507.00	1517.00	1274.00	0.943	10.937

Tabla IV. 47.- Medida de la toxicidad durante el proceso de biodegradación para el tensioactivo GCP 215 a 12 mg/L

TENSIOACTIVO: GLUCOPÓN 215 ENSAYO DE BIODEGRADACIÓN: Estático MEDIDA DE LA TOXICIDAD: Determinación del porcentaje de inhibición Identificación: TB12 Condiciones del ensayo: 25 °C, Oscuridad, Agitación orbital						
Concentración inicial: 12 mg/L						
Tiempo de incubación: 15 min						
t, horas	I ₀ blanco	I _t blanco	I ₀ muestra	I _t muestra	f _k	% Inhibición
0.000	1003.00	1280.00	1168.00	1175.00	1.160	13.311
6.500	799.40	1069.00	825.70	1007.00	1.337	8.800
23.250	789.00	1067.00	868.40	1089.00	1.352	--
30.000	841.00	930.90	844.50	941.70	1.106	--
46.500	760.00	898.10	850.90	1009.00	1.181	--
54.000	176.80	221.30	171.60	180.20	1.251	16.104
71.000	171.60	232.70	167.70	187.00	1.356	17.770
190.750	103.60	179.50	103.70	177.40	1.732	1.265

Tabla IV. 48.- Medida de la toxicidad durante el proceso de biodegradación para el tensioactivo GCP 600 a 100 mg/L

TENSIOACTIVO: GLUCOPÓN 600 ENSAYO DE BIODEGRADACIÓN: Estático MEDIDA DE LA TOXICIDAD: Determinación del porcentaje de inhibición Identificación: TB13 Condiciones del ensayo: 25 °C, Oscuridad, Agitación orbital						
Concentración inicial: 100 mg/L						
Tiempo de incubación: 15 min						
t, horas	I₀ blanco	I_t blanco	I₀ muestra	I_t muestra	f_k	% Inhibición
0.000	1083.00	1749.00	1220.00	364.70	1.614	81.489
15.000	990.00	1218.00	1033.00	547.00	1.230	--
23.000	1540.00	1705.00	1613.00	844.30	1.107	--
39.500	1020.00	925.70	1034.00	447.40	0.907	52.323
47.500	958.00	1157.00	981.00	511.90	1.207	56.780
63.500	944.50	1129.00	956.50	521.70	1.195	54.370
71.250	1127.00	1249.00	1113.00	807.50	1.108	--
88.500	1141.00	1316.00	1194.00	845.60	1.153	38.596
161.000	1088.00	1261.00	1088.00	843.30	1.159	33.124

Tabla IV. 49.- Medida de la toxicidad durante el proceso de biodegradación para el tensioactivo GCP 650 a 20 mg/L

TENSIOACTIVO: GLUCOPÓN 650 ENSAYO DE BIODEGRADACIÓN: Estático MEDIDA DE LA TOXICIDAD: Determinación del porcentaje de inhibición Identificación: TB14 Condiciones del ensayo: 25 °C, Oscuridad, Agitación orbital						
Concentración inicial: 20 mg/L						
Tiempo de incubación: 15 min						
t, horas	I ₀ blanco	I _t blanco	I ₀ muestra	I _t muestra	f _k	% Inhibición
0.000	2058.00	2121.00	2076.00	1556.50	1.030	27.263
6.500	2058.00	2121.00	2057.00	1539.50	1.030	27.381
22.750	2058.00	2121.00	1994.50	1555.50	1.030	24.291
30.500	2132.00	2539.00	2186.00	2147.50	1.190	20.342
47.000	2132.00	2539.00	2155.00	1987.00	1.190	19.823
54.750	2132.00	2539.00	2195.00	2116.50	1.190	17.028
71.000	2132.00	2539.00	2281.00	2009.00	1.190	--
94.750	2717.00	2512.00	2673.50	2342.50	0.924	5.230
167.750	2717.00	2512.00	2620.50	2433.50	0.924	--
190.750	2717.00	2512.00	2573.00	2325.00	0.924	2.248
215.000	2717.00	2512.00	2536.00	2386.00	0.924	--

Tabla IV. 50.- Medida de la toxicidad durante el proceso de biodegradación para el LAS a 25 mg/L

TENSIOACTIVO: LAS ENSAYO DE BIODEGRADACIÓN: Estático MEDIDA DE LA TOXICIDAD: Determinación del porcentaje de inhibición Identificación: TB15 Condiciones del ensayo: 25 °C, Oscuridad, Agitación orbital						
Concentración inicial: 25 mg/L						
Tiempo de incubación: 15 min						
t, horas	I ₀ blanco	I _t blanco	I ₀ muestra	I _t muestra	f _k	% Inhibición
5.750	1647.00	2036.00	1725.50	1774.00	1.236	16.832
29.500	1647.00	2036.00	1705.50	1728.00	1.236	18.041
94.500	2158.00	2005.00	2183.00	1791.00	0.929	11.698
189.750	1879.00	2112.00	1930.00	1983.00	1.124	8.578
262.250	2058.00	2112.00	2120.00	1974.00	1.030	9.650

Tabla IV. 51.- Medida de la toxicidad durante el proceso de biodegradación para el LAS a 50 mg/L

TENSIOACTIVO: LAS ENSAYO DE BIODEGRADACIÓN: Estático MEDIDA DE LA TOXICIDAD: Determinación del porcentaje de inhibición Identificación: TB16 Condiciones del ensayo: 25 °C, Oscuridad, Agitación orbital						
Concentración inicial: 50 mg/L						
Tiempo de incubación: 15 min						
t, horas	I ₀ blanco	I _t blanco	I ₀ muestra	I _t muestra	f _k	% Inhibición
0.000	1331.00	1880.00	1347.00	1267.00	1.412	33.406
6.500	1331.00	1880.00	1401.00	1266.34	1.412	36.062
31.000	1331.00	1880.00	1379.00	1313.00	1.412	32.590
78.750	1480.00	1774.00	1500.00	1178.00	1.198	34.481
95.250	1846.00	2253.00	1884.00	1434.00	1.220	37.635
167.500	1846.00	2253.00	1874.00	1502.50	1.220	34.306
198.500	1846.00	2253.00	1860.00	1508.00	1.220	33.556
359.500	1846.00	2253.00	1820.00	1961.00	1.220	11.689

Tabla IV. 52.- Medida de la toxicidad durante el proceso de biodegradación para las mezclas tensioactivas Findet 1214N/23 y GCP 650

TENSIOACTIVO: F1214N/23+GCP 650 ENSAYO DE BIODEGRADACIÓN: Estático MEDIDA DE LA TOXICIDAD: Determinación del porcentaje de inhibición Identificación: TB17 Condiciones del ensayo: 25 °C, Oscuridad, Agitación orbital						
Concentración inicial: 10+10 mg/L						
Tiempo de incubación: 15 min						
t, horas	I ₀ blanco	I _t blanco	I ₀ muestra	I _t muestra	f _k	% Inhibición
6.500	1172.00	1550.00	1231.00	1507.00	1.322	7.434
22.750	1529.00	1572.00	1465.00	1446.00	1.028	3.996
30.000	1529.00	1572.00	1512.00	1487.00	1.028	4.344
71.000	1661.00	1751.00	1648.00	1719.00	1.054	1.020
142.000	1661.00	1751.00	1660.00	1744.00	1.054	0.339
167.500	1661.00	1751.00	1660.00	1749.00	1.054	0.054
190.750	1661.00	1751.00	1661.50	1738.00	1.054	0.772

Tabla IV. 53.- Medida de la toxicidad durante el proceso de biodegradación para las mezclas tensioactivas Findet 1214N/23 y GCP 650

TENSIOACTIVO: F1214N/23+GCP 650 ENSAYO DE BIODEGRADACIÓN: Estático MEDIDA DE LA TOXICIDAD: Determinación del porcentaje de inhibición Identificación: TB18 Condiciones del ensayo: 25 °C, Oscuridad, Agitación orbital						
Concentración inicial: 15+5 mg/L						
Tiempo de incubación: 15 min						
t, horas	I ₀ blanco	I _t blanco	I ₀ muestra	I _t muestra	f _k	% Inhibición
0.000	1100.00	1350.00	1206.50	1370.00	1.227	7.479
6.500	1327.00	1396.00	1316.00	1319.00	1.051	4.725
22.750	1327.00	1396.00	1284.50	1290.50	1.051	4.493
47.000	1327.00	1396.00	1285.00	1326.00	1.051	1.909
54.750	859.40	1501.00	930.80	1601.00	1.746	1.519
71.000	859.40	1501.00	942.10	1605.00	1.746	2.457
95.750	859.40	1501.00	954.00	1627.00	1.746	2.354
167.750	859.40	1501.00	982.60	1699.00	1.746	1.000

5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.1. DESARROLLO DE MÉTODOS DE ANÁLISIS PARA EL ESTUDIO DE LA BIODEGRADACIÓN PRIMARIA

5.1.1. MÉTODO SIMPLIFICADO DE ANÁLISIS PARA LA DETERMINACIÓN DE TENSIOACTIVOS ANIÓNICOS (MBAS)

Actualmente los tensioactivos más empleados en las formulaciones de detergentes y otros productos de limpieza que se utilizan diariamente, son los tensioactivos aniónicos y dentro de ellos el alquilbenceno sulfonato lineal (LAS), que representa el 40% de todos los tensioactivos producidos.

En 1994 la producción de LAS en USA, Europa occidental y Japón fue de $8.40 \cdot 10^5$ Tm (Scott, 2000). De los $2.8 \cdot 10^9$ Kg de tensioactivos producidos en Europa en 1998, casi $0.42 \cdot 10^9$ Kg corresponden a LAS (AISE-CEFIC, 1999). En España, el consumo "per capita" se encuentra alrededor de los 5.6 g de LAS/hab/día. (Moreno, 1984). Teniendo esto en cuenta, el contenido de este tipo de sustancias en un agua residual urbana suele ser del orden del 5-10% del total de residuos orgánicos.

Estos tensioactivos llegan a las plantas de tratamiento de aguas residuales donde se degradan parcialmente en condiciones aerobias y se adsorben en los lodos que serán aplicados posteriormente al suelo. Finalmente son vertidos a la red fluvial y a la tierra, siendo uno de los principales factores que afectan al ecosistema natural (McEvoy, 1985). Por tanto, es de gran importancia la determinación adecuada de la concentración de tensioactivos aniónicos, así como la aplicación de procedimientos simplificados y rápidos que nos permitan seguir su biodegradación en función del tiempo.

En los últimos años se han intentado desarrollar nuevas técnicas analíticas para la cuantificación de tensioactivos tanto aniónicos como no iónicos, así como los intermedios de la biodegradación (Rin, 2000). Los tensioactivos aniónicos se determinan usualmente por métodos espectrofotométricos utilizando azul de metileno, siendo este el método estándar utilizado para la determinación de agentes de superficie en muestras de agua (COM, 2002). Sin embargo, este método oficial es un procedimiento largo y tedioso que requiere grandes cantidades de cloroformo para su aplicación.

Este método está basado en la formación de un par iónico entre el tensioactivo aniónico (AS) y el azul de metileno (MB) según la reacción:

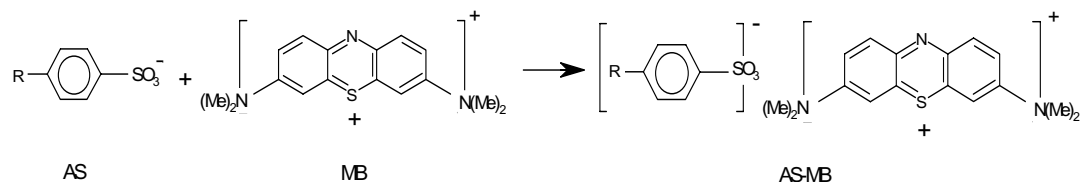


Figura V. 1.- Reacción de formación del par iónico tensioactivo aniónico-azul de metileno

Según el método oficial, se requieren tres extracciones sucesivas del par iónico AS-MB contenido en 100 ml de muestra previamente alcalinizada, con 15, 10 y 10 ml de cloroformo cada vez (Figura V. 2). Para evitar posibles interferencias el extracto de cloroformo se limpia de nuevo con una solución de lavado y se lleva a 100 ml con cloroformo. La determinación del par iónico se realiza por espectrofotometría midiendo la absorbancia a 650 nm.

Se han publicado numerosos métodos simplificados que ayudan a reducir las cantidades de reactivo, utilizando sodio dodecilsulfato como tensioactivo aniónico estándar (Chitikela, 1995), utilizando adsorbentes (Moskvin, 1996) o reduciendo el volumen de muestra y de reactivos empleados (Koga, 1999). Sin embargo estos métodos implican también procedimientos tediosos sin la posibilidad de la eliminación de la etapa de filtración.

Este procedimiento de análisis se hace especialmente complicado en el caso del seguimiento de la biodegradación de tensioactivos aniónicos, que por imperativos legales debe realizarse para poder ser utilizados comercialmente. Para ello es necesario realizar sucesivas determinaciones del tensioactivo a bajas concentraciones hasta su biodegradación total.

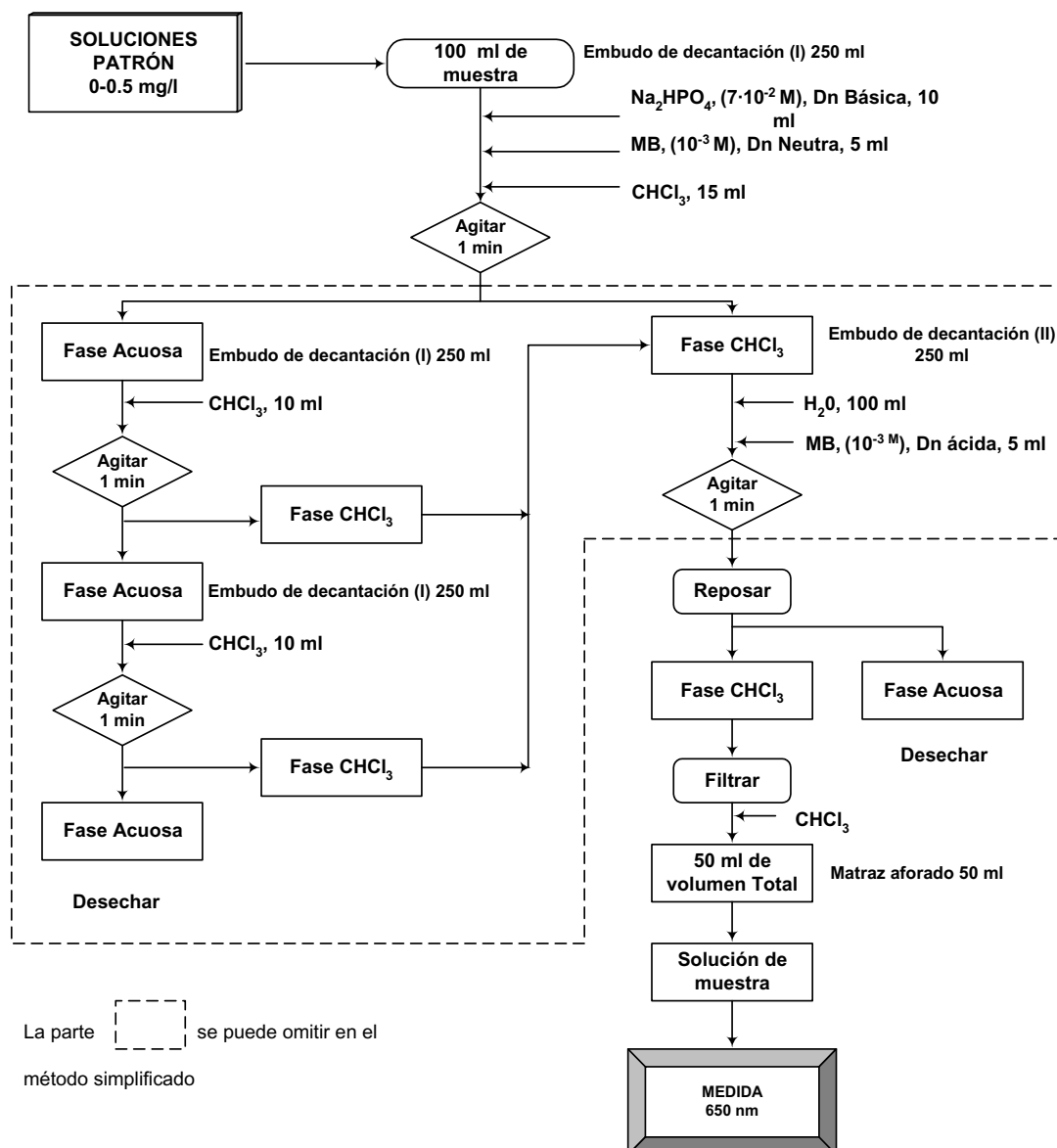
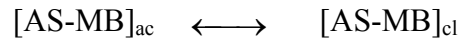


Figura V. 2.- Procedimiento analítico normalizado para la determinación de tensioactivos aniónicos

Los equilibrios de reparto de las sustancias AS (tensioactivo aniónico), MB (azul de metileno) y el par iónico asociado AS-MB, entre agua y cloroformo han sido investigados cuantitativamente (Koga, 1999), así como la estabilidad de cada especie en las respectivas fases, demostrando que tanto las moléculas de AS como MB solas, nunca se transferían a la fase clorofórmica si no están asociadas formando el par iónico AS-MB.

El equilibrio de transferencia de materia entre fases del par iónico AS-MB, puede representarse de la siguiente forma:



Ecuación V. 1

y su constante de equilibrio de reparto por la expresión:

$$K = \frac{[AS - MB]_{cl}}{[AS - MB]_{ac}}$$

Ecuación V. 2

donde el subíndice "cl" indica la concentración en la fase clorofórmica y el subíndice "ac" indica su concentración en la fase acuosa.

Teniendo en cuenta la definición de concentración, cociente entre el número de moles (n_{AS-MB}) y el volumen de la fase en la que está disuelto, la concentración del par iónico AS-MB en cada una de las fases, vendrá dada en la fase clorofórmica por:

$$[AS - MB]_{cl} = \frac{n_{AS-MB_{cl}}}{V_{cl}}$$

Ecuación V. 3

y en la fase acuosa por:

$$[AS - MB]_{ac} = \frac{n_{AS-MB_{ac}}}{V_{ac}}$$

Ecuación V. 4

Sustituyendo en la expresión de la constante de equilibrio (Ecuación V. 2) y teniendo en cuenta que el número total de moles de tensioactivo viene dado por:

$$n_t = n_{AS-MB_{ac}} + n_{AS-MB_{cl}}$$

Ecuación V. 5

se obtiene:

$$K = \frac{n_{AS-MB_{cl}}}{n_t - n_{AS-MB_{ac}}} \uparrow \cdot \frac{V_{ac}}{V_{cl}} \downarrow$$

Ecuación V. 6

Es posible realizar una extracción cuantitativa en una sola etapa desplazando el equilibrio de transferencia del par iónico AS-MB hacia la fase orgánica, aumentando mucho la cantidad de cloroformo respecto de la cantidad de muestra.

Se han probado distintas relaciones (volumen de muestra)/(volumen de cloroformo) empleado en la extracción, así como diferentes tiempos de agitación, obteniéndose los mejores resultados cuando se ponen en contacto 5 ml de muestra, previamente alcalinizada, con el colorante azul de metileno y con 4 ml de cloroformo, agitando durante un minuto y 5 minutos de reposo. La absorbancia debida al par iónico AS-MB en la fase clorofórmica se mide a 650 nm directamente en el tubo de ensayo sin necesidad de filtración. Procedimiento descrito en el apartado 3.4.1.1. de Materiales y Métodos.

Teniendo en cuenta estos resultados, en la presente Tesis Doctoral se propone una simplificación del método espectrofotométrico del azul de metileno para la determinación de tensioactivos aniónicos en aguas residuales (Figura V. 3). Este procedimiento se ha aplicado para el seguimiento de la biodegradación primaria del LAS.

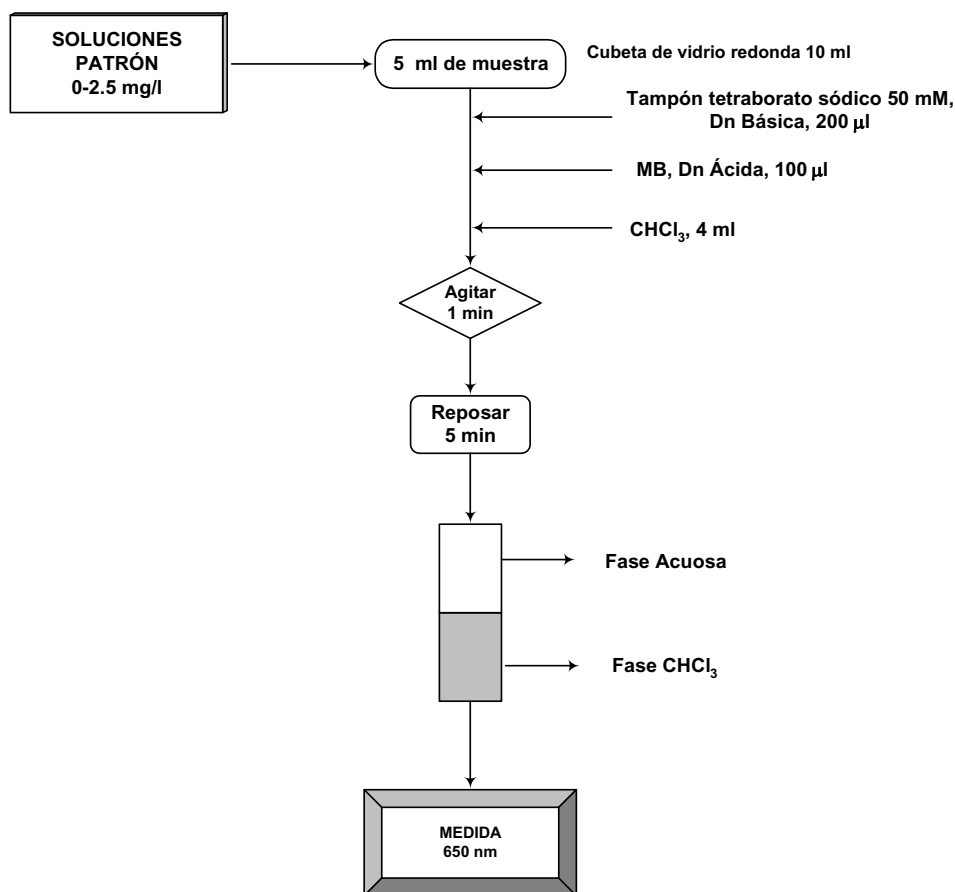


Figura V. 3.- Procedimiento analítico simplificado para la determinación de tensioactivos aniónicos

Para comprobar la bondad del método analítico empleado se han determinado los parámetros de calidad utilizando el modelo de cálculo propuesto por Cuadros y col. (Cuadros 1993; 1996), que se basa en la utilización del conjunto de datos obtenidos en un experimento de calibración.

5.1.1.1. Parámetros de calidad del método analítico

Los parámetros de calidad del método analítico propuesto se han calculado a partir de rectas de calibrado obtenidas en el rango de concentración de tensioactivo comprendido entre 0 y 2.5 mg/L. En la Figura V. 4 se muestran, a título de ejemplo, los valores de absorbancia medidos a 650 nm frente a aire, para las concentraciones de tensioactivo de 0, 0.5, 1, 1.5, 2 y 2.5 mg/L. Cada medida se realizó por triplicado.

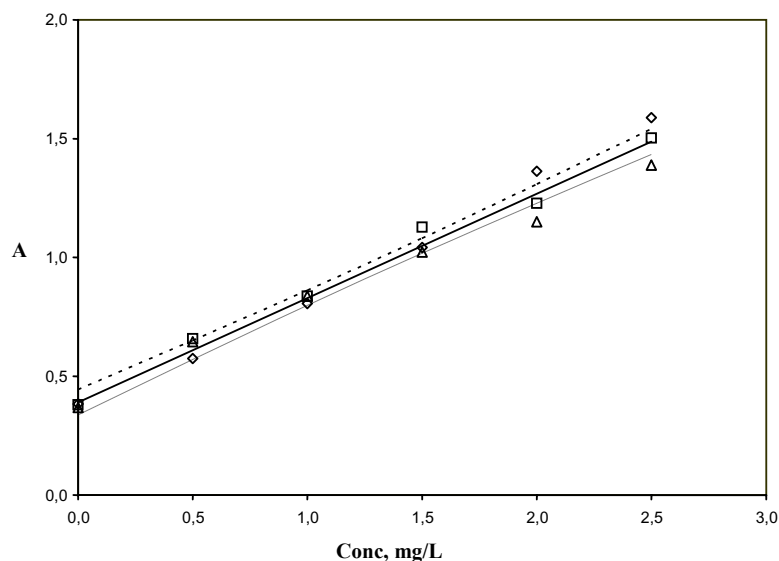


Figura V. 4.- Recta de calibrado obtenida para el LAS utilizando el método simplificado de las sustancias activas al azul de metileno

Para las rectas de calibración (Figura V. 4) se ensaya un ajuste lineal por mínimos cuadrados ordinario (OLS) que minimiza la distancia de los residuos a la recta de regresión. La curva de calibración se muestra en la Figura V. 4 y los parámetros del análisis de regresión: desviación estándar de la ordenada en el origen S_a , de la pendiente S_b , de regresión S_r , el coeficiente de correlación, r y el coeficiente de determinación R^2 , se muestran en la Tabla V. 1.; a es la ordenada en el origen y b la pendiente de la recta de regresión.

Tabla V. 1.- Parámetros del análisis de regresión

a	0.3907
b	0.4385
S_a	0.01657
S_b	0.02509
S_r	0.06000
r	0.98877
R^2	97.7677

El modelo de regresión OLS sólo es aplicable si los datos de partida cumplen una serie de requisitos previos tales como: aleatoriedad e independencia de la variable respuesta, normalidad de la variable respuesta, ausencia de errores aleatorios en la variable independiente, linealidad e igualdad de varianzas u homocedasticidad. Generalmente, se

asumen como ciertos los tres primeros y sólo se comprueban la linealidad y la homocedasticidad.

Linealidad y homocedasticidad

La linealidad "in-line" describe la ausencia de curvatura en la línea de calibración. La distribución aleatoria de los residuos en torno al eje central (Figura V. 5) así como el valor de $P_{LOF} \geq 0.01$ ($P_{LOF} = 0.9335$) del test de lack of fit (LOF) descarta un comportamiento curvo. Por tanto, el modelo lineal empleado en la regresión es correcto.

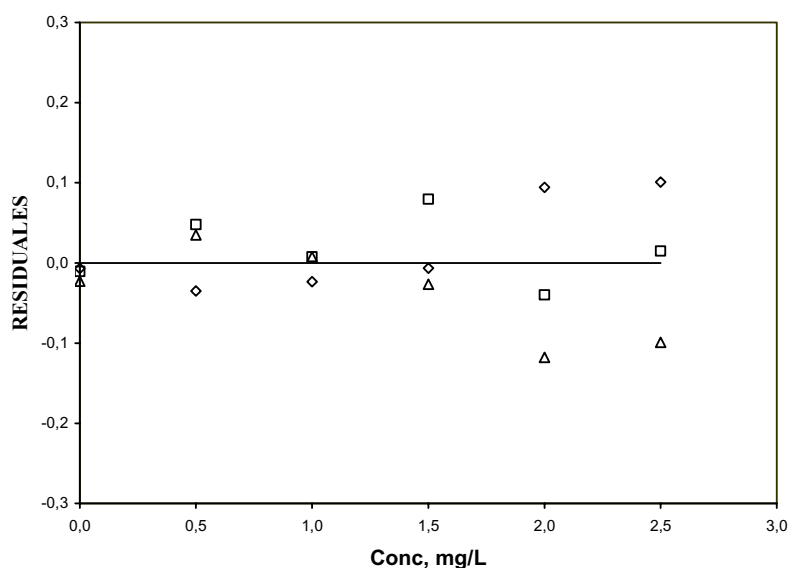


Figura V. 5.- Gráfico de residuos

La Linealidad "on-line" mide la dispersión de los datos alrededor de la línea de calibración y determina el rango de valores para los cuales se cumple que existe una relación lineal entre la señal y la concentración. La linealidad "on-line" se puede evaluar a partir del coeficiente de determinación R^2 , la desviación estándar relativa de la pendiente (S_b/b) y a partir de la expresión:

$$LIN_{OL}(\%) = \left(1 - \frac{S_b}{b}\right) \cdot 100$$

Ecuación V. 7

Los valores obtenidos para estos parámetros son, respectivamente, 97.7677, 0.059 y $LIN_{OL} = 94.1\%$.

La homocedasticidad ó igualdad de varianzas se muestra en el gráfico de residuales (Figura V. 5). La dispersión de los puntos en torno a la línea central parece aumentar conforme aumenta el valor de concentración. Existen, por tanto, evidencias de posible heterocedasticidad, esto es, de que las varianzas no sean homogéneas y que dependan de la concentración. Para confirmar ó descartar este hecho se hace el test de Cochran y el test de Barlett. Los valores de P obtenidos son respectivamente 0.37621 y 0.06226. En ambos test el valor de P es ≥ 0.05 , por tanto no hay una diferencia estadísticamente significativa entre los cuadrados de la media a un nivel de confianza del 95%, y las varianzas son homogéneas.

La curva de calibración obtenida viene dada por la ecuación:

$$A_{650} = 0.3907 + 0.4385 \cdot [AS]$$

Ecuación V. 8

Sensibilidad

Hay dos formas de expresar la sensibilidad de un método analítico: la sensibilidad de calibración ($SENS_{cal}$) que mide la relación entre la señal instrumental y la concentración de analito y la sensibilidad analítica ($SENS_{anal}$) que es la menor diferencia de concentración que un método analítico puede discernir (a la sensibilidad analítica también se le conoce con el nombre de resolución). La primera se evalúa a partir de la pendiente de calibración, b, y la segunda a partir del cociente S_r/m , donde S_r es la desviación estándar de regresión. Los valores obtenidos para la sensibilidad son:

$$SENS_{cal} = b = 0.4385 \quad \frac{\text{unidades de absorbancia}}{\text{mg/L}}$$

Ecuación V. 9

$$SENS_{anal} = \frac{S_r}{b} = 0.14 \quad \text{mg/L}$$

Ecuación V. 10

que indican, respectivamente, que un incremento de la concentración de 1 mg/L supone un aumento de la señal analítica de 0.4385 unidades y que el método distingue cambios de concentración de 0.14 mg/L.

Precisión

La precisión mide el grado de incertidumbre de un resultado analítico. Es debida a la dispersión de la señal del instrumento y al uso de valores de la pendiente y la ordenada en el origen estimados a partir de la recta de calibración para transformar la señal instrumental medida en concentración. Matemáticamente se expresa por la desviación estándar relativa de la concentración, S_c/c , y tiene un valor distinto a cada concentración. A partir de los datos de calibrado se puede obtener S_c para cada concentración a partir de la expresión:

$$S_c = \sqrt{\left(\frac{S_r}{b}\right)^2 \left(\frac{1}{n} + \frac{1}{m}\right) + \left(\frac{S_b}{b}\right)^2 (c - \bar{c})^2}$$

Ecuación V. 11

donde n es el número de puntos de la recta de calibrado, m el número de réplicas, c la concentración de tensioactivo, y \bar{c} la concentración media de tensioactivo en el intervalo de concentraciones considerado. En la Tabla V. 2 se muestran los valores de S_c para cada valor de concentración.

Tabla V. 2.- Valores de precisión obtenidos en el rango de valores de 0 a 2.5 mg/L

Conc. LAS, mg/L	S_c	S_c/c
0.0	0.0726	---
0.5	0.0831	0.166
1.0	0.0924	0.092
1.5	0.1009	0.067
2.0	0.1087	0.054
2.5	0.1160	0.046

$m=3, n=6, \bar{c}=1.25\text{mg/L}$

Límites inferiores

➤ Límite de detección (DL)

Es la menor concentración que puede detectarse con razonable certeza por un procedimiento analítico determinado. Utilizando la aproximación de la IUPAC, el límite de detección se calcula a partir de la expresión: $DL=3 \cdot S_{c0}$. El valor obtenido para el límite de detección es de 0.22 mg/L.

➤ Límite de cuantificación (QL)

Representa la mínima concentración cuantificable por el método analítico. Se calcula a partir de la expresión: $QL=10 \cdot S_{c0}$. El valor obtenido para el límite de cuantificación es de 0.73 mg/L.

Los parámetros de calidad obtenidos en el método simplificado de sustancias activas al azul de metileno demuestran que este procedimiento es adecuado para el análisis de tensioactivos aniónicos en aguas y en ensayos de biodegradación, en el rango de 0-2.5 mg/L.

El método utilizado supone una extracción cuantitativa en una sola etapa con una considerable reducción de la cantidad de muestra a ensayar, la cantidad de cloroformo utilizada en la extracción y el tiempo requerido para llevar a cabo el ensayo. Este procedimiento requiere solo 5 ml de muestra, 4 ml de disolvente de extracción (cloroformo) y 1/10 del tiempo de análisis comparado con el método oficial. Además el método es aplicable para el seguimiento del proceso de biodegradación primaria de tensioactivos aniónicos y puede utilizarse para el control de éstos con vistas a su posible utilización en formulaciones comerciales.

5.1.2. MÉTODOS DE ANÁLISIS PARA DETERMINACIÓN DE ALCOHOLES GRASOS ETOXILADOS

5.1.2.1. Método colorimétrico del yodo-yoduro

Los alcoholes grasos etoxilados pertenecen al grupo de tensioactivos no iónicos que se utilizan ampliamente como emulsificantes, solubilizantes, agentes dispersantes y en formulaciones detergentes.

La determinación de estos tensioactivos se realiza usualmente aplicando el método de Wickbold (apartado 3.4.1.2 Wickbold, 1972), pero este procedimiento requiere una amplia experimentación analítica y largos tiempos de ensayo. En la presente Tesis Doctoral se ha puesto a punto un procedimiento analítico aplicable a tensioactivos no iónicos etoxilados: el método colorimétrico del yodo-yoduro.

Este método sencillo basado en la formación de un complejo coloreado entre el tensioactivo y el reactivo yodo-yoduro (apartado 3.4.1.3). En la Figura V. 6 se muestra un esquema de este procedimiento.

Este método ha sido aplicado para la medida de la concentración de los diferentes AGE comerciales utilizados en este trabajo: Findet 10/15, Findet 10/18, Findet 1214N/16, Findet 1214N/23, Findet 1618A/18, Findet 1618A/23. También se ha aplicado al nonilfenol polietoxilado puesto pertenece a la familia de tensioactivos etoxilados y reacciona con el reactivo yodo-yoduro.

El intervalo de concentraciones ensayado está comprendido entre 0 y 20 mg/L. Los resultados obtenidos para los diferentes tensioactivos muestran una buena correlación entre la señal instrumental medida y la concentración (Figura V. 7).

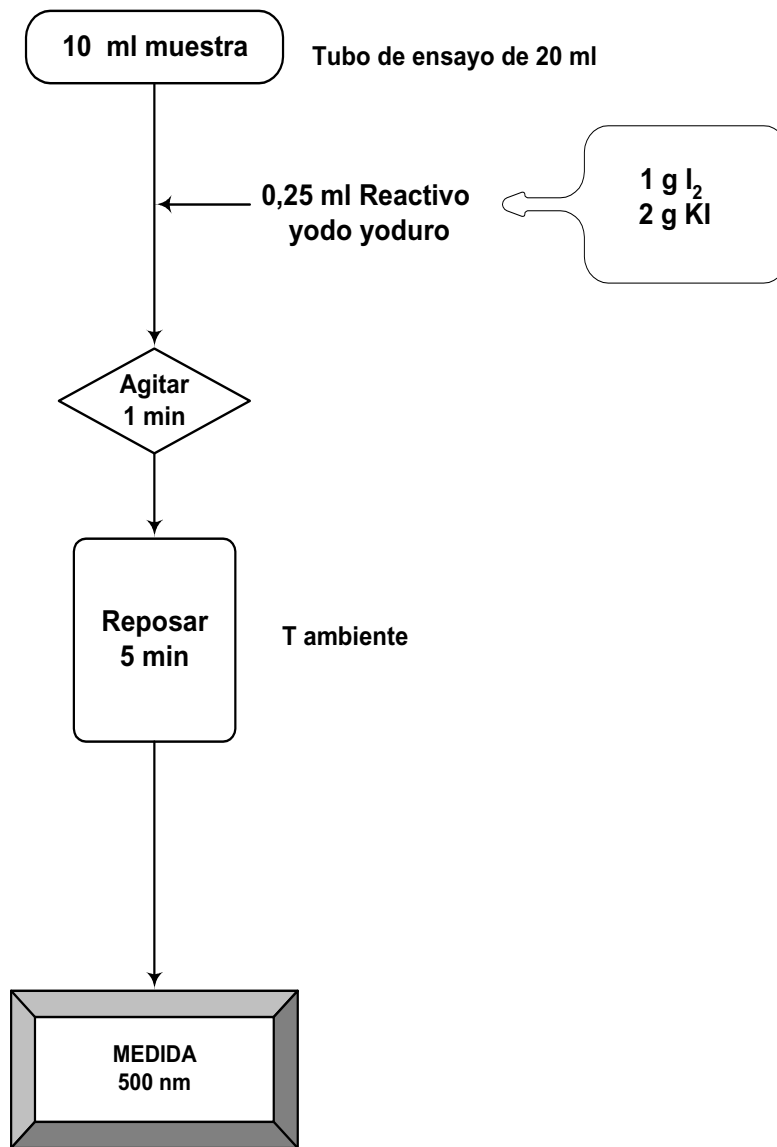


Figura V. 6.- Procedimiento analítico para el método colorimétrico del yodo-yoduro para la determinación de tensioactivos no iónicos

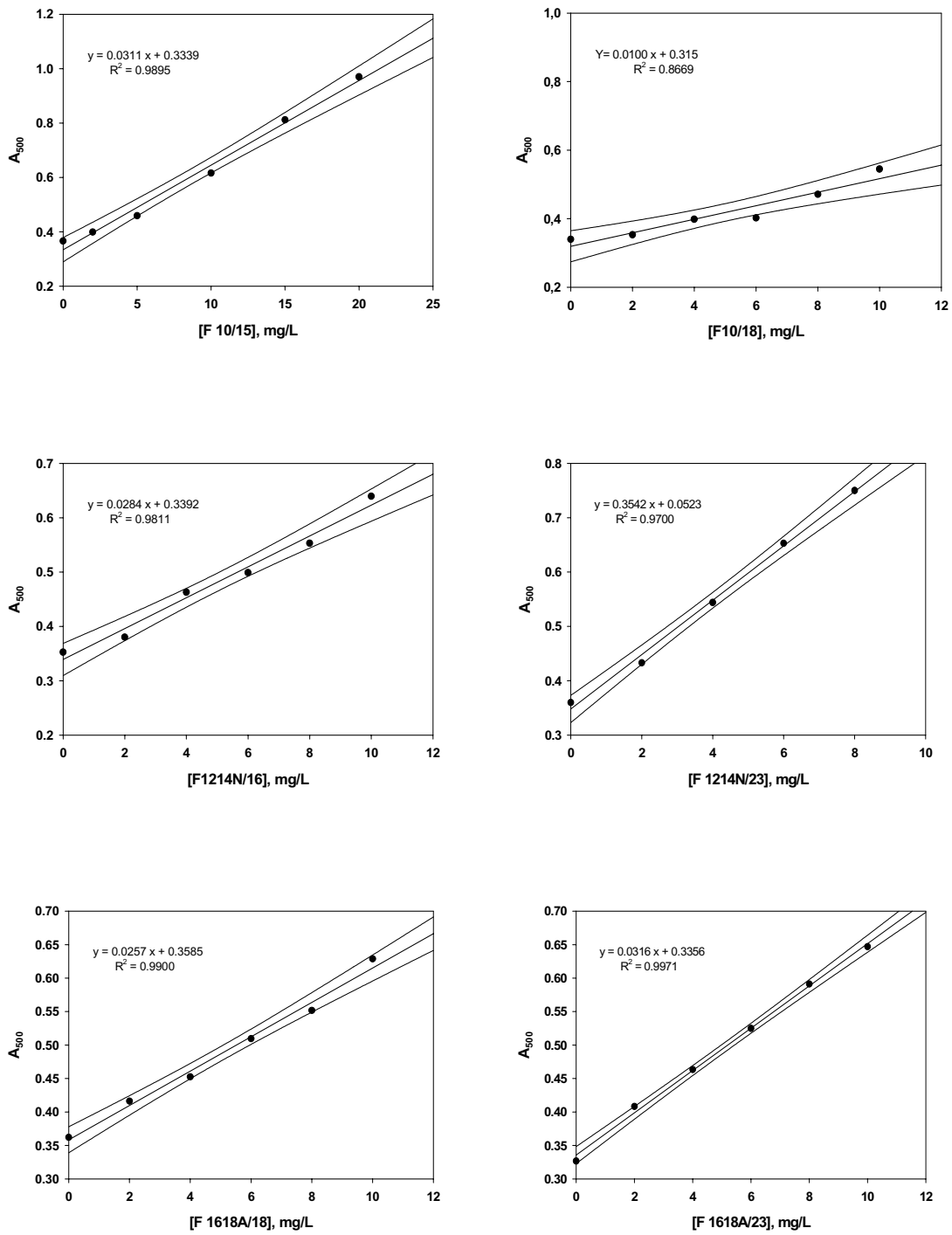


Figura V. 7.- Rectas de calibrado obtenidas para los distintos tensioactivos no iónicos etoxilados utilizando el método colorimétrico del yodo-yoduro

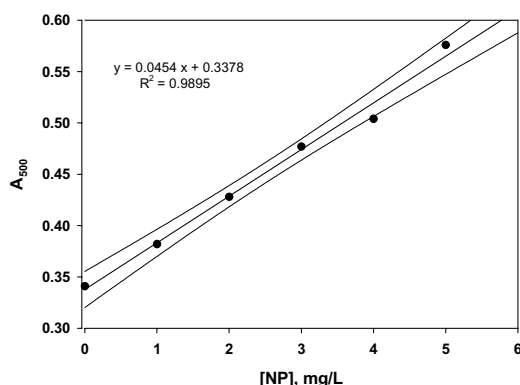


Figura V. 7.- (Continuación). Rectas de calibrado obtenidas para los distintos tensioactivos no iónicos etoxilados utilizando el método colorimétrico del yodo-yoduro

Las rectas de calibración han sido obtenidas utilizando tres réplicas para cada valor de concentración. Estos estándares incluyen el blanco como un valor adicional, porque su señal instrumental está sujeta al mismo tipo de errores que el resto de los puntos.

Los parámetros de calibración para los tensioactivos ensayados se recogen en la Tabla V. 3. La Linealidad viene expresada en %, la sensibilidad analítica en mg/L, la precisión en % (para 1 mg/L), el límite de detección en mg/L, b y m, representan la ordenada en el origen y pendiente de la recta de calibración respectivamente.

Tabla V. 3.- Parámetros de calidad de las rectas de calibración obtenidas por el método colorimétrico del reactivo yodo yoduro para distintos tipos de tensioactivos etoxilados

	F10/15	F 10/18	F1214N/16	F1214N/23	F1618A/18	F1618A/23	NPEO
b	0.3339	0.3150	0.3392	0.3542	0.3585	0.3356	0.3378
m	0.0311	0.0100	0.0284	0.0523	0.0257	0.0316	0.0454
r²	0.9895	0.8669	0.9811	0.9700	0.9899	0.9971	0.9895
Linealidad	94.85	89.00	92.96	95.22	94.94	97.47	94.93
Sensibilidad	0.90	1.41	0.58	0.53	0.42	0.22	0.21
Precisión	5.00	0.48(*)	3.31	0.95 (*)	0.81	1.43	1.96
LD	1.74	2.13	1.26	0.72	0.91	0.67	0.47

(*) Precisión para 2 mg/L

Los mejores resultados (menor límite de detección y sensibilidad) son para el NPEO, seguido de Findet 1618A/23 y Findet 1214N/23. Estos resultados indican que la bondad del método analítico depende del número de moles de óxido de etileno del tensioactivo. Si representamos la sensibilidad y el límite de detección frente al número de moles de óxido de etileno (Figura V. 8), se observa que estos valores disminuyen con el número de OE de la molécula de tensioactivo, observándose un comportamiento anómalo para el tensioactivo Findet 10/18.

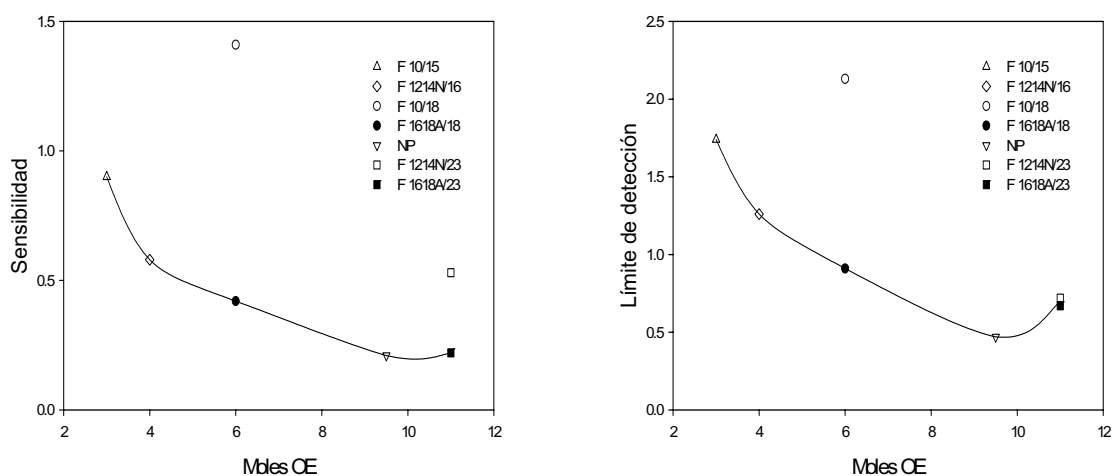


Figura V. 8.- Variación de la sensibilidad analítica y el límite de detección con el número de moles de OE presentes en los tensioactivos no iónicos etoxilados

Se puede concluir, por tanto, que el método colorimétrico del yodo-yoduro es viable cuando el número de moléculas de OE es mayor de 5 y no es recomendable para un número menor, al menos en el rango de concentraciones de 0 a 5 mg/L, rango de interés en los estudios de biodegradación en aguas residuales.

5.1.2.2. Método de Wickbold con el Reactivo de Dragendorff

Puesta a punto del método

La medida de la concentración de los alcoholes grasos etoxilados también se puede realizar por el método de Wickbold o BiAS (Wickbold, 1972). Este método consiste en la precipitación cuantitativa del tensioactivo con el reactivo de Dragendorff. El precipitado obtenido se disuelve y se valora el Bi presente en la disolución que es proporcional a la cantidad de tensioactivo presente en la muestra (apartado 3.4.1.2.).

La determinación del Bi puede realizarse por espectrofotometría, se mide la absorbancia a 263.5 nm del complejo EDTA-Bi formado, o bien por potenciometría con un electrodo de Pt/CIAg, y utilizando como agente valorante pirrolidinil ditiocarboxilato sódico. Ambos métodos han sido aplicados.

El principal inconveniente que tiene la aplicación del método de Wickbold, tanto por el procedimiento espectrofotométrico como potenciométrico, cuando se aplica al análisis de tensioactivos en aguas residuales, es que para evitar interferencias e incrementar la concentración de tensioactivo en la muestra, el análisis precisa de la extracción previa del tensioactivo de su matriz acuosa.

En la Tabla V. 4 se muestran los resultados obtenidos de los procesos de extracción. Se ha evaluado el tanto por ciento de recuperación por este método obteniéndose un valor de recuperación del tensioactivo comprendido entre el 68 y el 72% cuando se hacen 5 extracciones (sin sal) consecutivas partiendo de una cantidad inicial de 500 µg de Findet 1214N/23 (500 ml de una disolución de 0.001 g/L de concentración).

Tabla V. 4.- Porcentaje de recuperación de distintos tensioactivos no iónicos etoxilados

Extracción sin sal				
TENSIOACTIVO	$\mu\text{g F}_0$	$\mu\text{g F medidos}$	SDR	% R
Findet 1214N/23	500	343.46	20.8	68.69
Findet 10/15	500	286.17	16.96	57.23
Findet 1618A/23	500	362.37	8.25	72.5
Extracción con sal				
TENSIOACTIVO	$\mu\text{g F}_0$	$\mu\text{g F medidos}$	SDR	% R
Findet 1214N/23	500	461.48	20.18	92.30
Findet 1618A/23	500	441.91	36.46	88.38

Donde $\mu\text{g F}_0$ son los microgramos de Findet inicial, $\mu\text{g F}$ son los microgramos de Findet medido (valor medio obtenido a partir de 5 determinaciones), SDR es la desviación estándar relativa obtenida a partir de 5 determinaciones y % R el tanto por ciento de recuperación de tensioactivo.

Los resultados obtenidos (en las extracciones sin sal) para los distintos tensioactivos ensayados ponen de manifiesto que el método está sujeto a un error sistemático en torno al 30% cuyo origen está en la etapa de extracción previa del tensioactivo, siendo ésta la principal fuente de error.

Este error puede reducirse al 8% (Tabla V. 4) si durante el proceso de extracción se incorporan sales (100 g de ClNa y 5 NaHCO_3) al medio a fin de facilitar la extracción del tensioactivo en el acetato de etilo. La adición de estas sales se hace en forma sólida y haciendo burbujear aire en la columna de extracción durante 5 minutos. Por tanto, se aplica este procedimiento de extracción para la determinación de tensioactivos no iónicos.

En el método de Dragendorff potenciométrico la medida de la cantidad de Bi se realiza con un electrodo de platino que es sensible a todos los iones metálicos presentes en la disolución, constituyendo éstos una interferencia importante en el procedimiento de análisis. Para eliminar estas interferencias hay que ser muy cuidadosos con la limpieza del material utilizado, sobre todo con el filtro de vidrio sinterizado que puede absorber algunos de los iones de las disoluciones empleadas en el análisis, fundamentalmente el Ba, y utilizar productos químicos de condiciones de pureza elevadas.

Los ensayos iniciales demostraron que el acetato de etilo (de PANREAC y calidad PA) utilizado en la etapa previa de extracción del tensioactivo daba valores por exceso

(Tabla V. 5) conduciendo a sobreestimaciones de la concentración de partida, y que era necesario limpiar los filtros exhaustivamente tras la extracción.

Tabla V. 5.- Porcentaje de recuperación para el Findet 1214N/23 sin destilar el acetato de etilo

TENSIOACTIVO	$\mu\text{g F}_0$	$\mu\text{g F medidos}$	SDR	% R
Findet 1214N/23	500	607.21	26.55	121.44

Al objeto de aislar las posibles fuentes de error se llevaron a cabo 4 extracciones consecutivas utilizando una muestra de agua destilada en ausencia total de tensioactivo. Los resultados fueron los siguientes:

Tabla V. 6.- Extracciones con acetato de etilo utilizando agua destilada

V_c/f	V_m	V_B	V_G	$\mu\text{g tensioactivo}$
5.342/0.936	1000	2.123	4.60	125
5.342/0.936	1000	2.123	5.95	194
5.342/0.936	1000	2.123	6.67	230
5.342/0.936	1000	2.123	5.94	193

Donde V_c es el volumen en ml, gastados en el contraste de pirrolidinil ditiocarboxilato sódico; f es el factor de normalización calculado como $f = 5/V_c$, donde 5 es el volumen de disolución patrón; V_m es el volumen en ml, de la toma de muestra; V_B es el volumen en ml, de la disolución de pirrolidinil ditiocarboxilato sódico consumido por el ensayo en blanco; V_G es el volumen en ml, de la disolución de pirrolidinil ditiocarboxilato sódico consumido por la muestra. Los μg de tensioactivo están expresados como mg/L de NP 10 (apartado 3.4.1.1.).

Como se aprecia en la Tabla V. 6 los ensayos en blanco dan una señal positiva, evidenciando la presencia de un tensioactivo que no hay (antes de llevar a cabo los ensayos de extracción se tuvo la precaución de limpiar el material con mezcla etanol-ácido clorhídrico).

A la luz de estos datos se estudió la posibilidad de que el acetato de etilo utilizado en la etapa previa de la extracción del tensioactivo fuera el responsable de estos resultados.

Para investigar la posible influencia de este reactivo se procedió como sigue: se vierten 200 ml de acetato de etilo en un matraz redondo, tal como se hace con los extractos del proceso de extracción, se evapora el disolvente y a continuación el residuo se somete al proceso de análisis del tensioactivo por el método de BiAS potenciométrico. Como demuestran los resultados de la Tabla V. 7 el acetato da una señal positiva.

Tabla V. 7.- Comprobación de la interferencia del acetato de etilo en el proceso de extracción

V_c/f	V_{acetato}	V_B	V_G	$\mu\text{g tensioactivo}$
5.263/0.950	200	2.051	4.35	59
5.263/0.950	200	2.051	3.45	36
5.263/0.950	200	2.051	4.01	50.5

Para eliminar estas interferencias se destiló el acetato de etilo antes de su utilización, y para garantizar que el filtro de vidrio sinterizado estuviera libre de cualquier ión metálico, se procedió a su limpieza al finalizar cada sesión de trabajo con metanol, para eliminar cualquier resto de tensioactivo que pudiese estar absorbido, y con EDTA 0.1 pH 10 (Wyrwas, 1993) para eliminar los iones metálicos, finalmente se enjuaga con agua desionizada y el material queda listo para su uso (apartado 3.6).

Aplicación del método potenciométrico

En el caso del método de Wickbold potenciométrico la concentración de tensioactivo se expresa como mg/L de un NPEO con 10 moles de oxido de etileno (NP 10). Para poder expresar la concentración en términos de la sustancia de ensayo se ha establecido la equivalencia entre el tensioactivo de referencia (NP 10) y los diferentes tensioactivos no iónicos ensayados.

En la Tabla V. 8 se muestra la equivalencia (E) entre los μg de Findet y los μg de NP 10 medidos (Ecuación V. 12) para todos los tensioactivos no iónicos etoxilados utilizados. También se presentan las desviaciones estándar correspondientes a la determinación de los distintos tensioactivos por este método, siendo menores del 9% en todos los casos.

$$E = \frac{\mu\text{g} (\text{Fin det})}{\mu\text{g} (\text{NP10})}$$

Ecuación V. 12

Tabla V. 8.- Equivalencia entre AGE y NP 10 para el método de Wickbold potenciométrico

FINDET	$\mu\text{g } F_0$	$\mu\text{g NP10}$	SDR (%)	E
F10/18	500	523.71	5.99	0.95
F10/15	250	244.01	6.72	1.02
F1214N/16	500	387.52	3.76	1.29
F1214N/23	500	657.36	3.58	0.76
F1618A/18	500	372.86	5.23	1.34
F1618A/23	500	611.02	8.25	0.82

donde $\mu\text{g } F_0$ son los microgramos de Findet inicial, $\mu\text{g NP10}$ son los μg de Findet medido como NP 10 y SDR (%) es la desviación estándar relativa obtenida a partir de 5 determinaciones.

Aplicación del método espectrofotométrico

Para una correcta aplicación del método espectrofotométrico en aguas residuales, es necesario realizar una recta patrón cada vez que se realiza una medida de concentración de tensioactivo. El método potenciométrico no requiere este procedimiento y necesita de un menor tiempo de análisis.

El método de Wickbold, analizando el Bi mediante técnicas espectrofotométricas se ha aplicado para los tensioactivos Findet 1214N/23 y Findet 10/15 en el rango de 200 a 1000 μg . Las rectas de calibrado obtenidas se recogen en la Figura V. 9, observándose una buena correlación entre la señal instrumental medida y la concentración. Las rectas de calibración se han obtenido utilizando tres réplicas para cada valor de concentración. Estos estándares incluyen el blanco como un valor adicional, porque su señal instrumental está sujeta al mismo tipo de errores que el resto de los puntos

Los valores obtenidos para la linealidad, sensibilidad, precisión y límite de detección se muestran en la Tabla V. 9. La linealidad viene expresada en %, la sensibilidad

analítica en μg , la precisión en % para 0.200 mg, el LD en μg , el LC en μg , y b y m son la ordenada en el origen y pendiente de la recta de calibración respectivamente.

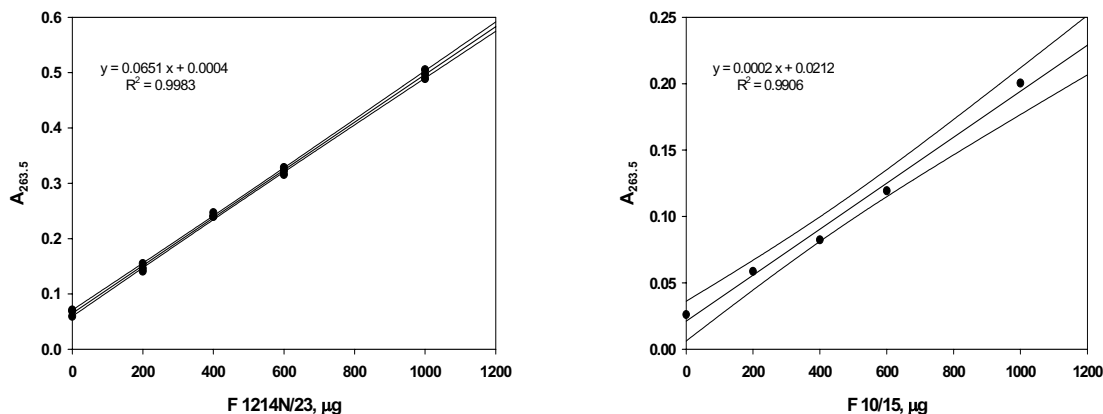


Figura V. 9.- Rectas de calibrado obtenidas para los Findet 1214N/23 y Findet 10/15 en el rango de 200 a 1000 μg por el método de Wickbold espectrofotométrico

Tabla V. 9.- Parámetros de calidad para los tensioactivos etoxilados Findet 1214N/23 y Findet 10/15 por el método de Wickbold espectrofotométrico

	F1214N/23	F10/15
b	0.0651	0.0212
m	0.0004	0.0002
r²	0.9991	0.9906
Linealidad	100	100
Sensibilidad	16.25	37.5
Precisión	2.25	6.5
LD	20.25	81

En la Tabla V. 9 se observa que por el método de Wickbold también se obtienen mayores valores de sensibilidad y menor límite de detección cuando el número de moléculas de óxido de etileno del tensioactivo es mayor.

5.1.2.3. Comparación de métodos de análisis para alcoholes grasos etoxilados

En la Tabla V. 10 se comparan los parámetros de calibración (linealidad, sensibilidad, precisión y límite de detección) obtenidos por el método de Wickbold y el método del yodo yoduro. Se observa que los valores obtenidos para la linealidad, sensibilidad, precisión y límite de detección son mejores para el método del yodo-yoduro en los casos comparados.

Tabla V. 10.- Comparación de los parámetros de calidad para los tensioactivos Findet 1214N/23 y Findet 10/15 por el método de Wickbold y método del yodo yoduro

	MÉTODO DE WICKBOLD		METODO YODO YODURO	
	F1214N/23	F10/15	F1214N/23	F10/15
b	0.0651	0.0212	0.3490	0.3340
m	0.0004	0.0002	0.0052	0.0031
r²	0.9991	0.9906	0.9899	0.9868
Linealidad	100	100	97.98	94.86
Sensibilidad	16.25	37.5	2.71	9.00
Precisión	2.25	6.5	9.2	48.6
LD	20.25	81	5.41	29.16

El método del yodo yoduro es una alternativa viable y mejor que el método de Wickbold, especialmente cuando el número de moléculas de óxido de etileno en el tensioactivo sea mayor de 5. Las ventajas de este método son las siguientes: se requiere menor volumen de muestra, menor tiempo de análisis y es menos caro, además puede realizarse directamente en la muestra y no necesita de la etapa previa de separación del tensioactivo que es la principal fuente de error del método de Wickbold.

En la Figura V. 10 se muestran los resultados de los ensayos de biodegradación obtenidos para el Findet 10/15 y el Findet 1214N/23 en los que se analizó la concentración por el método de Wickbold y por el método del reactivo yodo-yoduro.

Para el Findet 10/15, tensioactivo con 3 moles de OE, el método colorimétrico del yodo-yoduro no es adecuado para el seguimiento de la biodegradación primaria debido a su baja sensibilidad (apartado 5.1.2.1.). Sin embargo, para el Findet 1214N/23 con 11

moles de OE, se observa una buena concordancia entre los puntos obtenidos por ambos métodos.

En la Tabla V. 11 se resumen las ventajas e inconvenientes de los métodos aplicados en la determinación de tensioactivos no iónicos.

Tabla V. 11.- Comparación de los métodos de análisis para tensioactivos no iónicos

METODO	VENTAJAS	INCONVENIENTES
YODO-YODURO	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Menor volumen de muestra. ✓ Menor tiempo de realización. ✓ Mas barato. 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Aplicable cuando el n° de moles de OE >5.
REACTIVO DE DRAGENDORFF ESPECTROFOTOMÉTRICO	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Mayor sensibilidad. ✓ Menor límite de detección. 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Necesidad de concentrar la muestra. ✓ Errores apreciables en los procesos de extracción. ✓ Necesidad de realización de recta de calibrado en cada medida. ✓ Mayor tiempo de realización. ✓ Mayor complejidad en el análisis.
REACTIVO DE DRAGENDORFF POTENCIOMÉTRICO	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Mayor sensibilidad. ✓ Menor límite de detección. 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Interferencias de iones metálicos presentes en la medida. ✓ Necesidad de utilización de reactivos de extremada pureza. ✓ Necesidad de extremar las medidas de limpieza.

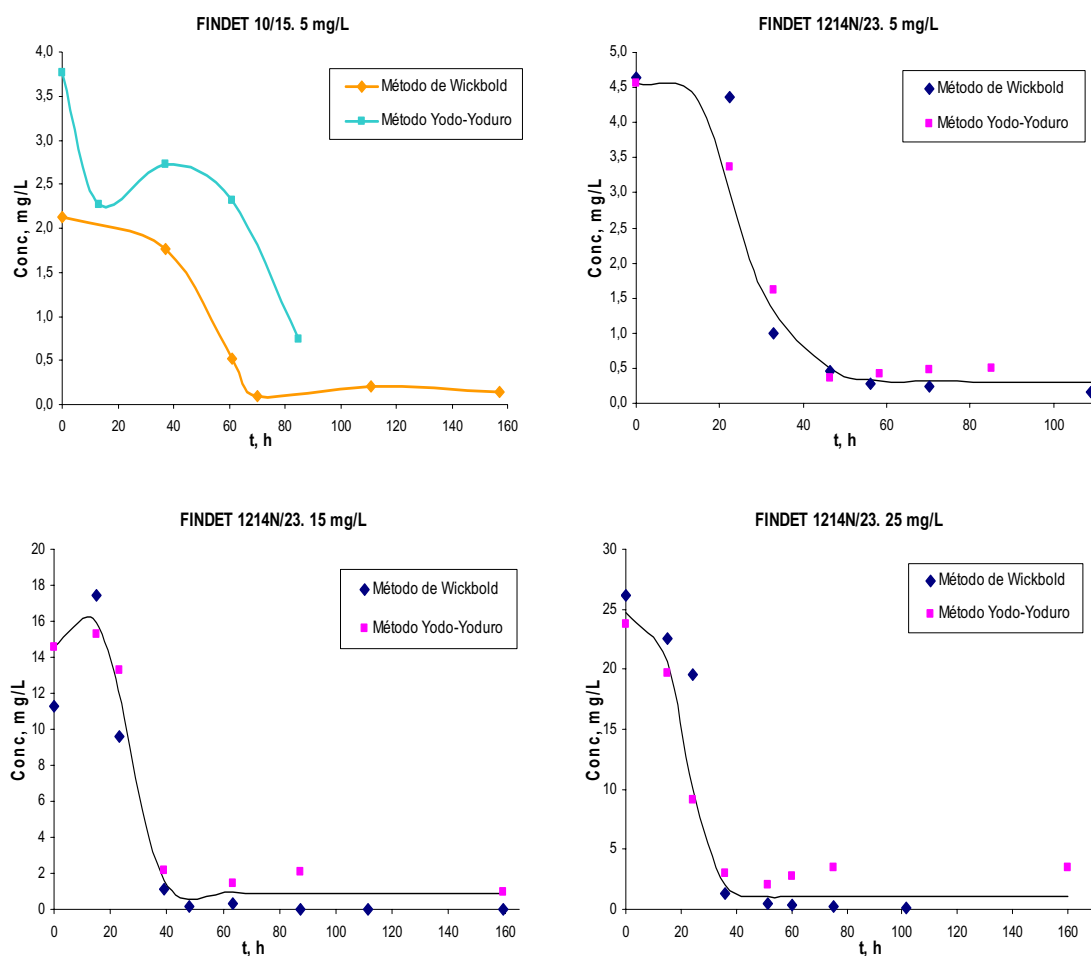


Figura V. 10.- Comparación de curvas de biodegradación para diferentes AGE utilizando el método de Wickbold y el método del yodo-yoduro

5.1.2.4. Aplicación de los métodos de análisis para mezclas tensioactivas de AGE y APG

Interferencias de APG en la determinación de tensioactivos no iónicos

Los tensioactivos alquilpoliglucósidos no reaccionan con el reactivo yodo yoduro, y por consiguiente este método no puede utilizarse para medir su concentración. Además se ha comprobado que los APG no interfieren en la medida de la concentración de tensioactivos etoxilados por el método colorimétrico del yodo-yoduro, por lo que éste método puede ser utilizado en la determinación de tensioactivos etoxilados en mezclas de

estos tensioactivos con APG, así como en procesos de biodegradación conjunta de estos tensioactivos no iónicos.

Para comprobar el hecho de que los APG no interfieren en la medida de tensioactivos etoxilados por el método del reactivo yodo-yoduro, se preparó una recta patrón para el tensioactivo Findet 1618A/18 y se analizaron dos muestras: la primera de ellas contenía 10 mg/L de GCP 650 y en la segunda se adicionaron 10 mg/L de Findet 1618A/18 a 10 mg/L de GCP 650. Los resultados se muestran en la Tabla V. 12. Los valores de la concentración medida son la media de tres réplicas.

Tabla V. 12.- Comprobación de la interferencia de APG en el método del yodo yoduro

Concentración inicial	Concentración medida, mg/L
10 mg/L GCP 650	0.810
10 mg/L GCP 650 + 10 mg/L Findet 1618A/18	10.891

Si comparamos el valor obtenido de 10.891 mg/L en presencia de 10 mg/L de GCP 650 con el valor esperado de 10 mg/L en ausencia de GCP para el Findet 1618A/18, se observa que se comete un error del 8.9 % de la determinación de la concentración en presencia de GCP 650. También se observa una pequeña señal de 0.81 mg/L en ausencia de Findet 1618A/18. La presencia de APG interfiere en la medida de la concentración de alcoholes grasos etoxilados por el método colorimétrico del yodo-yoduro, aunque esta interferencia es despreciable.

Aunque los alquilpoliglucósidos no pueden determinarse por el método de Wickbold si se ha encontrado que dan una pequeña señal en presencia de los alcoholes grasos etoxilados.

Para estudiar esta interferencia a 400 µg de Findet 1214N/23 se le adicionaron cantidades crecientes de GCP 650 y se midió su concentración a partir de la recta patrón obtenida para el Findet 1214N/23 utilizando el método de Wickbold espectrofotométrico. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla V. 13.

Tabla V. 13.- Medida de la cantidad de tensioactivo Findet 1214N/23 en presencia de cantidades variables de GCP 650

Cantidad inicial (μg)	Cantidad medida (μg)
400 μg F1214N/23 + 0 μg GCP 650	400.65
400 μg F1214N/23 + 100 μg GCP 650	411.37
400 μg F1214N/23 + 200 μg GCP 650	424.77
400 μg F1214N/23 + 400 μg GCP 650	446.22

Los resultados indican que la presencia de APG en la muestra interfiere proporcionando un valor de recuperación de tensioactivo mayor que la cantidad de partida, a razón del 11.48 μg por cada 100 μg de APG en la muestra (Tabla V. 13 y Figura V. 11).

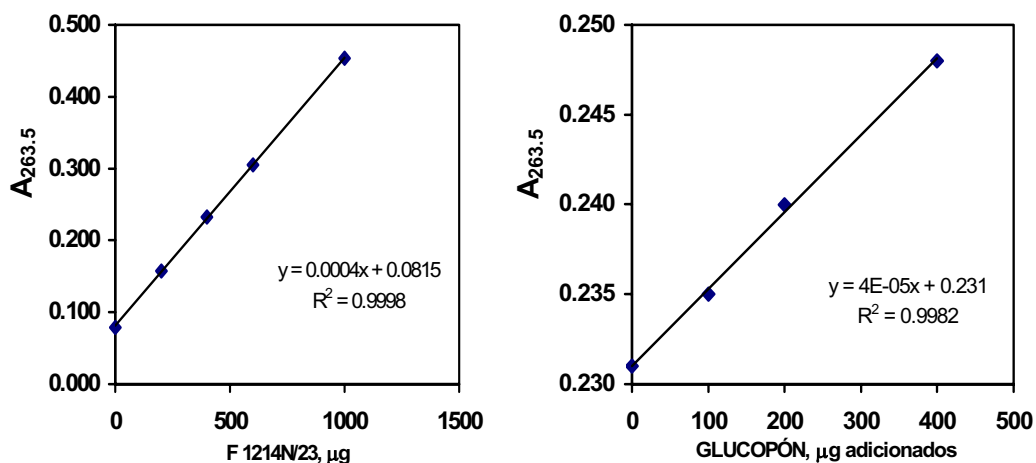


Figura V. 11.- Efecto de la cantidad de Glucopón 650 adicionado sobre la cantidad de Findet 1214N/23 medida (derecha). Los valores de cantidad de Findet 1214N/23 medida se obtuvieron por comparación de las absorbancias con su recta patrón correspondiente (izquierda)

Determinación de la fracción de alcoholes grasos etoxilados en el BEROL LFG 61

El hecho de que los APG den una pequeña señal en presencia de los AGE puede ser utilizado para estimar su presencia en productos comerciales que estén compuestos por mezclas de estos tensioactivos.

Se ha desarrollado un procedimiento analítico, basado en el método de las adiciones patrón, que permita analizar la composición del BEROL LFG 61 (producto comercial mezcla de AGE y APG). Para la medida de la composición en alcoholes grasos etoxilados

se ha utilizado el método de Wickbold analizando el Bi por espectrofotometría y potenciometría.

El método de las adiciones patrón se basa en que a una cantidad fija y medida de muestra a analizar, se le adicionan cantidades conocidas del analito cuya concentración se quiere medir. Se estudia como varía la propiedad medida con la cantidad de analito adicionado. Si la dependencia es lineal, la extrapolación de esta tendencia sobre el eje de abscisas proporciona la cantidad de analito de la muestra. De este modo se puede analizar la concentración de tensioactivo cancelando la interferencia debida a la presencia de APG.

Al no conocerse en principio el tipo de alcohol graso etoxilado que forma parte del producto, se midió como Findet 1214N/23, esto es, se supuso que el BEROL está compuesto por una mezcla de alquilglucósidos y Findet 1214N/23.

Se aplicó el método de las adiciones patrón para la determinación del contenido de alcoholes grasos etoxilados presentes de la siguiente forma: a 400 μg de BEROL, se le adicionaron, por separado, 0, 200, 400, 600 y 1000 μg de Findet 1214N/23 y se midieron las absorbancias a 263.5 nm frente a un blanco sometido al mismo proceso pero sin Findet 1214N/23, utilizando el método espectrofotométrico.

La extrapolación de la recta de calibrado sobre el eje de abscisas arroja un valor de 28 μg para la cantidad de tensioactivo no iónico del tipo alcohol graso etoxilado presente en la muestra y medido como Findet 1214N/23 (Figura V. 12). Este resultado determina que el tensioactivo está formado fundamentalmente por alquilpoliglucósidos, y su análisis por el método de Wickbold no podría realizarse de forma adecuada.

Para confirmar este hecho, se analizó el BEROL con el método potenciométrico, para lo cual, se precipitan los tensioactivos no iónicos del tipo alcohol graso etoxilado contenidos en 400 μg de BEROL con el reactivo de Dragendorff, se separa el precipitado, se disuelve y se determina la cantidad de Bi equivalente a la concentración de tensioactivo por potenciometría con una disolución valorada de pirrolidinil-1-ditiocarboxilato sódico. La cantidad de tensioactivo no iónico medida en los 400 μg de BEROL es de 39.53 μg de NP 10. Esta cantidad expresada como Findet 1214N/23 es de 30.04 μg . Este resultado no difiere significativamente del obtenido anteriormente y confirma que los alquilpoliglucósidos son el componente principal del BEROL.

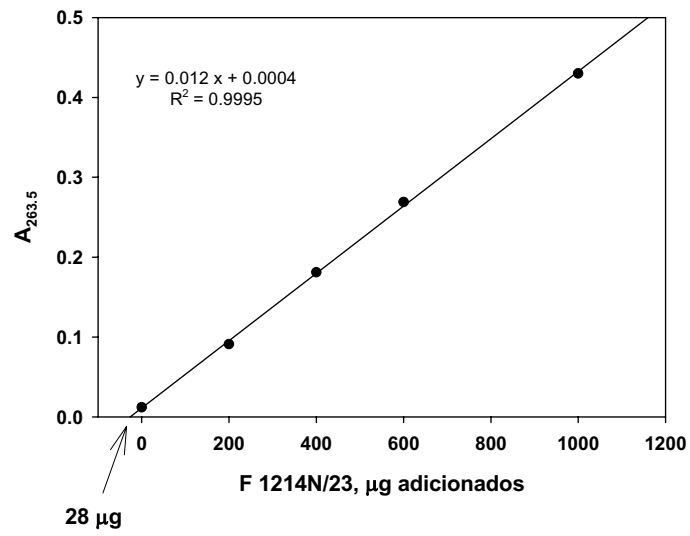


Figura V. 12.- Medida de la cantidad de tensioactivos no iónicos en el BEROL por el método de Wickbold espectrofotométrico y de las adiciones patrón.

5.2. BIODEGRADACIÓN DE ALCOHOLES GRASOS ETOXILADOS

Los alcoholes grasos etoxilados (AGE) son el segundo grupo más importante de tensioactivos, después del LAS, en cuanto a manufactura, y el primer grupo dentro de la familia de los tensioactivos no iónicos etoxilados (Szymanski, 2000). En Europa se venden cada año $5 \cdot 10^5$ toneladas de estos tensioactivos (Karsa, 1995), la mayoría de ellos utilizados en formulaciones detergentes. Los AGE son considerados como tensioactivos “fácilmente biodegradables”, sin embargo, los vertidos masivos de estos tensioactivos a las aguas residuales requieren un estricto control para prevenir la contaminación del medio ambiente acuático. Un elemento clave en este proceso es la evaluación de la biodegradabilidad para garantizar el uso de estos tensioactivos en las formulaciones domésticas o industriales.

Los alcoholes grasos etoxilados más típicos son los que van del rango de 9 a 18 átomos de carbono, y los más comunes son aquellos de 12 a 15 átomos de carbono o mezclas de ellos. Los AGE utilizados en este trabajo pertenecen a los llamados oleoquímicos, es decir, procedentes de fuentes naturales y renovables: Findet 10/15, Findet 10/18, Findet 1618A/18, Findet 1618A/23, Findet 1214N/16 y Findet 1214N/23, de Kao Corporation, S.A. Las propiedades de estos tensioactivos se describen en la Tabla III. 1. (apartado 3.1. de Materiales y Métodos). Los AGE seleccionados presentan diferente grado de etoxilación y diferente tamaño de cadena carbonada. De ahora en adelante utilizaremos la nomenclatura de la Tabla V. 14 para identificarlos: C indica el tamaño de la cadena carbonada y E el número medio de OE.

Tabla V. 14.- Nomenclatura de los AGE utilizados

NOMBRE COMERCIAL	NOMENCLATURA
FINDET 10/15	$C_{10}E_3$
FINDET 10/18	$C_{10}E_6$
FINDET 1214N/16	$C_{12-14}E_4$
FINDET 1214N/23	$C_{12-14}E_{11}$
FINDET1618A/18	$C_{16-18}E_6$
FINDET1618A/23	$C_{16-18}E_{11}$

Para el estudio de la biodegradación se han realizado experimentos a diferentes concentraciones iniciales que varían entre 5 y 50 mg/L. La concentración de tensioactivo residual se midió utilizando el método colorimétrico del reactivo yodo-yoduro (apartado 3.4.1.3.), excepto para el tensioactivo C₁₀E₃ que se analizó por el método de Wickbold (apartado 3.4.1.2.) al presentar un número de OE inferior a 5 (apartado 5.1.2.1.).

Con objeto de comprobar la actividad de la población microbiana presente en el medio de ensayo se realizaron ensayos de referencia con un tensioactivo fácilmente biodegradable (LAS). La concentración inicial del ensayo de referencia fue de 5 mg/L en todos los casos, y la biodegradación media alcanzada a los 5 días fue del 97.28 % ±1.54 (de acuerdo con la NORMA UNE 55-844-91 (UNE 55-844-91) para aceptar la validez del ensayo el porcentaje de biodegradación del patrón blando al cabo de 5 días debe ser mayor del 90% (apartado 3.3.1.6.)).

5.2.1. INFLUENCIA DEL GRADO DE ETOXILACIÓN Y LA LONGITUD DE LA CADENA CARBONADA SOBRE LA BIODEGRADACIÓN PRIMARIA

En la Figura V. 13 se representan los perfiles de biodegradación primaria obtenidos a una concentración inicial de 5 mg/L para todos los AGE ensayados (Tabla V. 14). La concentración se expresa como porcentaje de tensioactivo residual y como porcentaje de biodegradación alcanzado.

El porcentaje de tensioactivo residual se calcula a partir de la siguiente expresión:

$$\%Tensioactivo\ residual = \left(\frac{[S]_t}{[S]_0} \right) \cdot 100$$

Ecuación V. 13

donde:

[S]_t = concentración de sustrato en un instante t

[S]₀ = concentración de sustrato al comienzo del ensayo

Todos los perfiles de biodegradación obtenidos presentan tres fases bien diferenciadas:

1°. Fase de aclimatación de los microorganismos, caracterizada porque la concentración de tensioactivo se mantiene prácticamente constante. En esta primera etapa, y debido a la acumulación y absorción del tensioactivo en las interfases, se observan algunas variaciones de la concentración de tensioactivo residual.

2°. Disminución rápida de la concentración de tensioactivo debido a la metabolización por parte de los microorganismos del mismo. El 90% de la biodegradación se completa en un tiempo inferior a 3 días, excepto para el tensioactivo C₁₀E₃.

3°. Período donde la concentración de tensioactivo residual es prácticamente despreciable, aunque puede continuar la biodegradación de los metabolitos producidos durante el proceso de biodegradación.

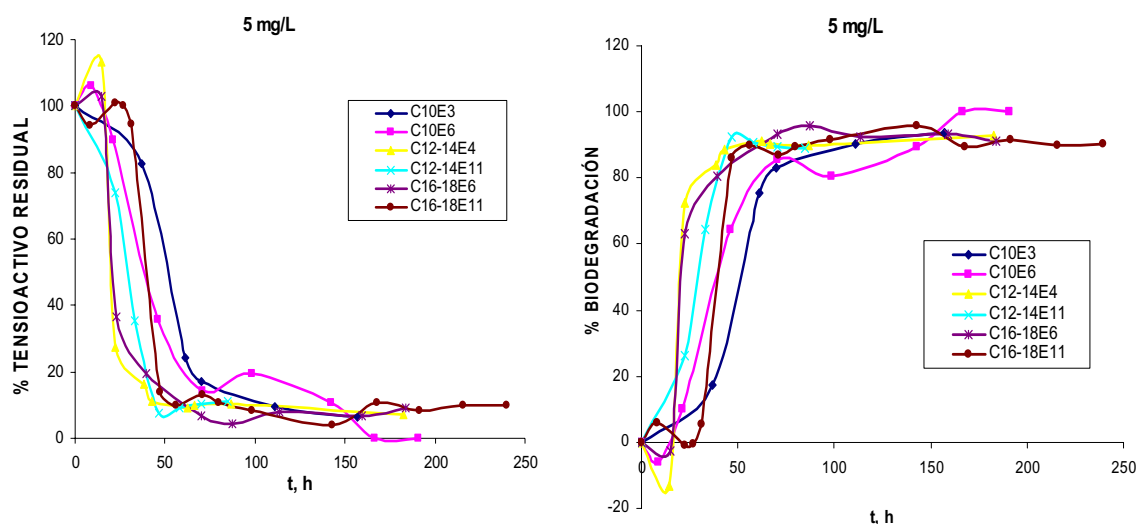


Figura V. 13.- Variación de la concentración de tensioactivo residual y del porcentaje de biodegradación con el tiempo para los AGE ensayados a 5 mg/L

Para todos los tensioactivos ensayados el porcentaje de biodegradación alcanzado es superior al 80% antes de los 4 días. La legislación vigente exige que se alcance un nivel mínimo del 80% de la biodegradación primaria cuando se aplica el test de la OCDE. Según esto, todos los tensioactivos ensayados a una concentración inicial de 5 mg/L pueden considerarse como biodegradables.

Para analizar la influencia del grado de etoxilación y del tamaño de la cadena carbonada sobre el proceso de biodegradación primaria, se comparan los resultados obtenidos para diferentes tensioactivos a las concentraciones iniciales de 5, 25 y 50 mg/L (Figura V. 14, Figura V. 15 y Figura V. 16). Con el fin de poder comparar los distintos

tensioactivos, la concentración residual de éstos se ha expresado como tanto por ciento de tensioactivo residual. Los puntos representan los porcentajes medios experimentales (dos réplicas).

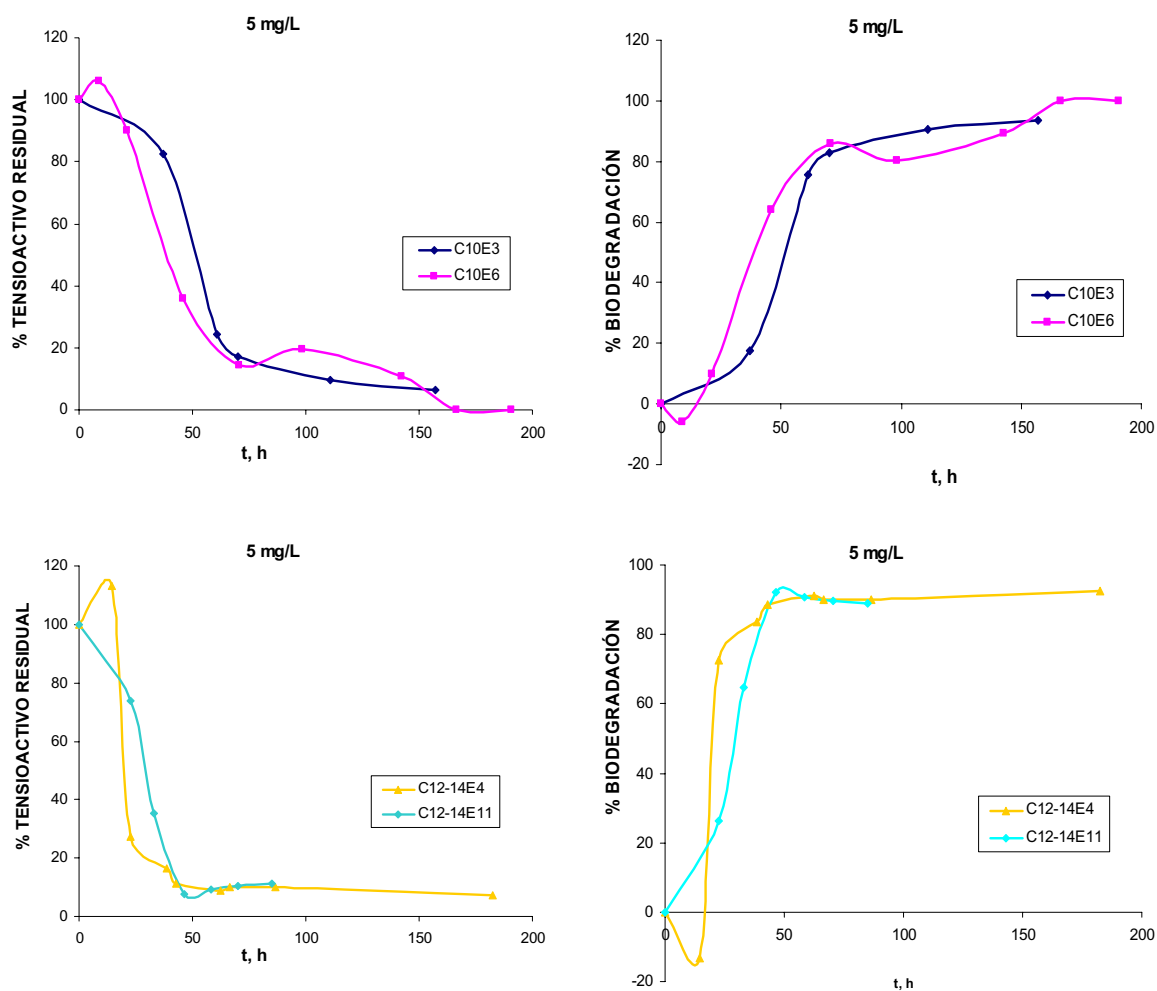


Figura V. 14.- Influencia del grado de etoxilación y el tamaño de la cadena carbonada sobre la biodegradación primaria para los AGE ensayados a la concentración inicial de 5 mg/L

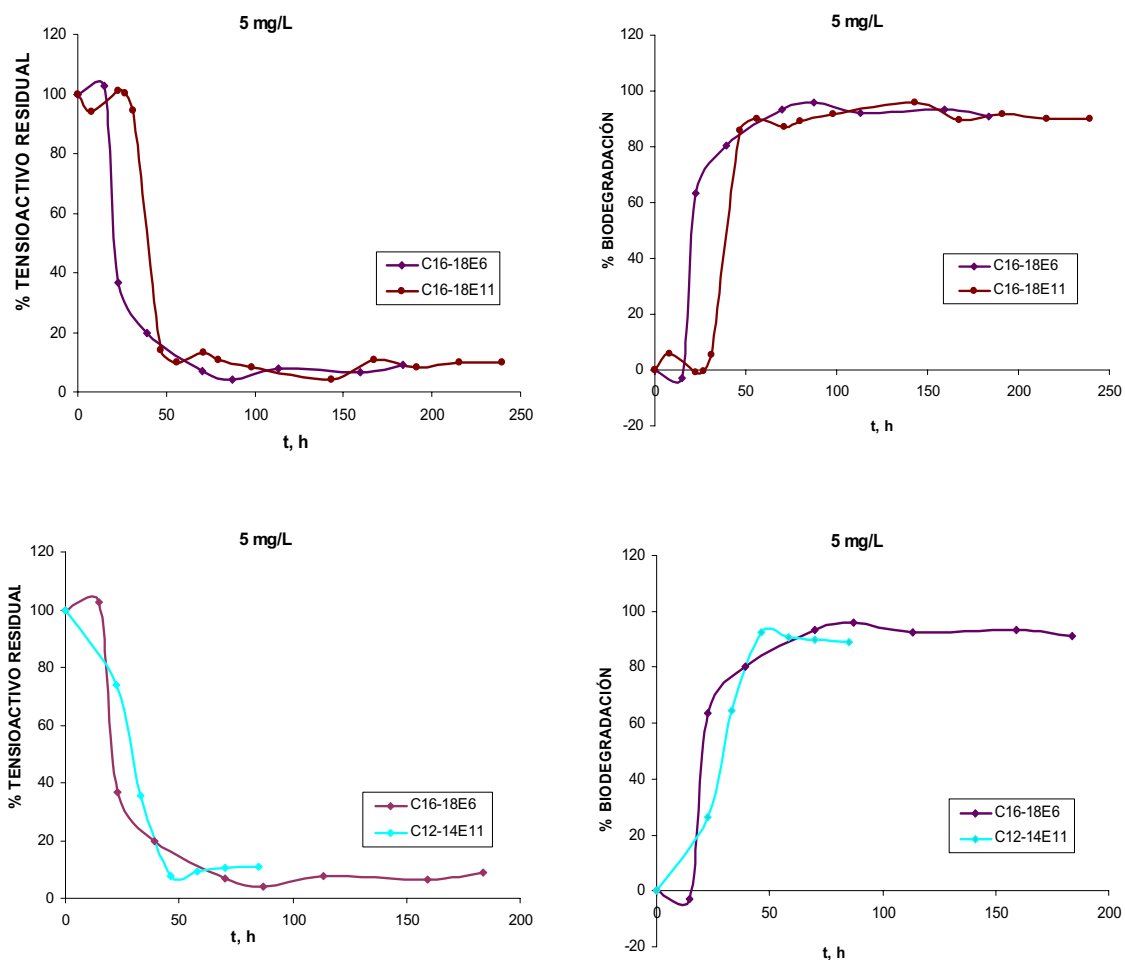


Figura V. 14.- (Continuación). Influencia del grado de etoxilación y el tamaño de la cadena carbonada sobre la biodegradación primaria para los AGE ensayados a la concentración inicial de 5 mg/L

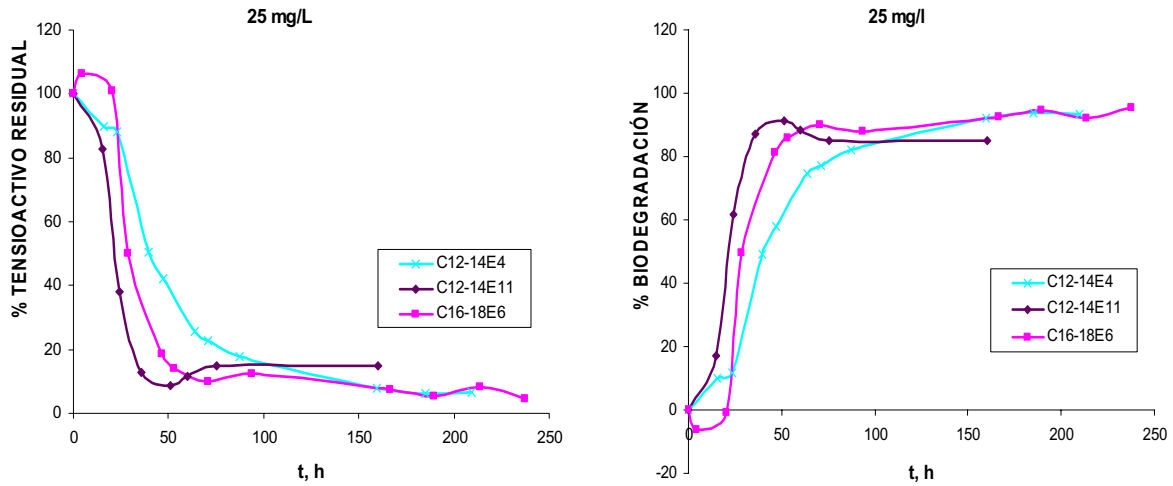


Figura V. 15.- Influencia del grado de etoxilación y el tamaño de la cadena carbonada sobre la biodegradación primaria para los AGE ensayados a la concentración inicial de 25 mg/L

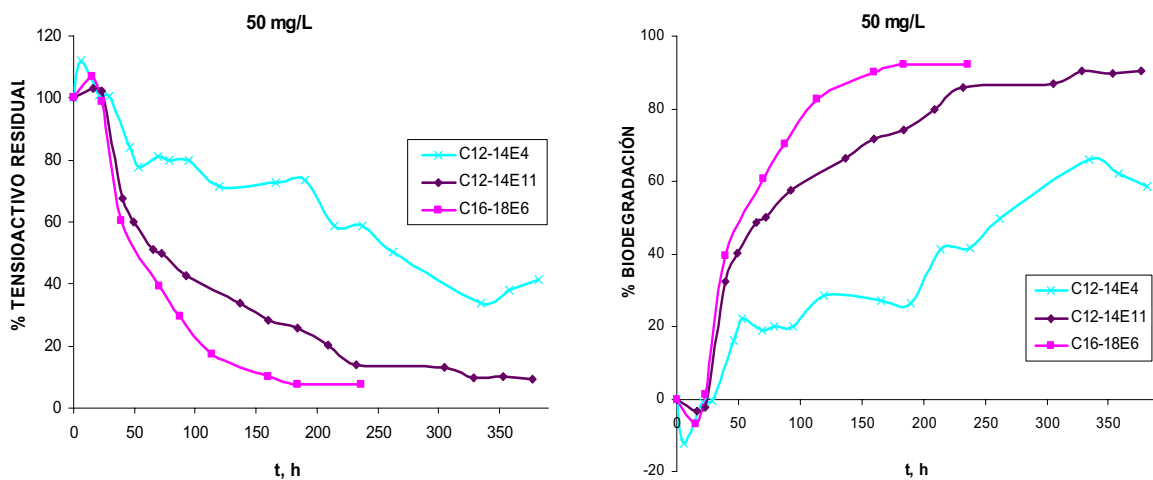


Figura V. 16.- Influencia del grado de etoxilación y el tamaño de la cadena carbonada sobre la biodegradación primaria para los AGE ensayados a la concentración inicial de 50 mg/L

Para todas las concentraciones ensayadas los resultados obtenidos parecen confirmar que ha tenido lugar una biodegradación preferente del tensioactivo de mayor longitud de cadena alquílica y mayor grado de etoxilación. Si consideramos la velocidad de biodegradación como la pendiente de la curva de biodegradación, se aprecia como la velocidad es superior (a las tres concentraciones estudiadas) para el tensioactivo de mayor cadena carbonada $C_{16-18}E_6$, es decir el tensioactivo de mayor cadena carbonada y etoxilada,

se degrada en mayor extensión y más rápidamente que el resto de tensioactivos ensayados, este hecho se observa de forma mas clara cuando se utilizan altas concentraciones de tensioactivo en el ensayo (Figura V. 16).

A través de la bibliografía se encuentran ejemplos de aumento, disminución, y valores aleatorios en la velocidad de biodegradación en relación a longitudes de cadena alquílica mayores (Patterson, 1970). Para ensayos de biodegradación en agua de río se encontró que la velocidad de biodegradación aumentaba para longitudes de cadena C_8 A C_{12} y disminuía de C_{12} a C_{18} . En otros ensayos la velocidad de biodegradación disminuía al pasar de una cadena C_{18} a C_8 pero con diferentes longitudes de cadena etoxilada. Sin embargo, teniendo en cuenta únicamente la parte hidrofóbica del tensioactivo, se encontraron evidencias de aumento de velocidad de biodegradación primaria para homólogos con longitudes de cadena alquílica mayores (Swisher, 1987).

5.2.2. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE TENSIOACTIVO EN EL PROCESO DE BIODEGRADACIÓN

Para estudiar la influencia de la concentración inicial de los tensioactivos AGE sobre la biodegradabilidad se han ensayado los tensioactivos $C_{12-14}E_4$, $C_{12-14}E_{11}$ y $C_{16-18}E_6$. En la Figura V. 17 se muestran los resultados obtenidos para la evolución del porcentaje de tensioactivo residual y el porcentaje de biodegradación en función del tiempo para las distintas concentraciones ensayadas.

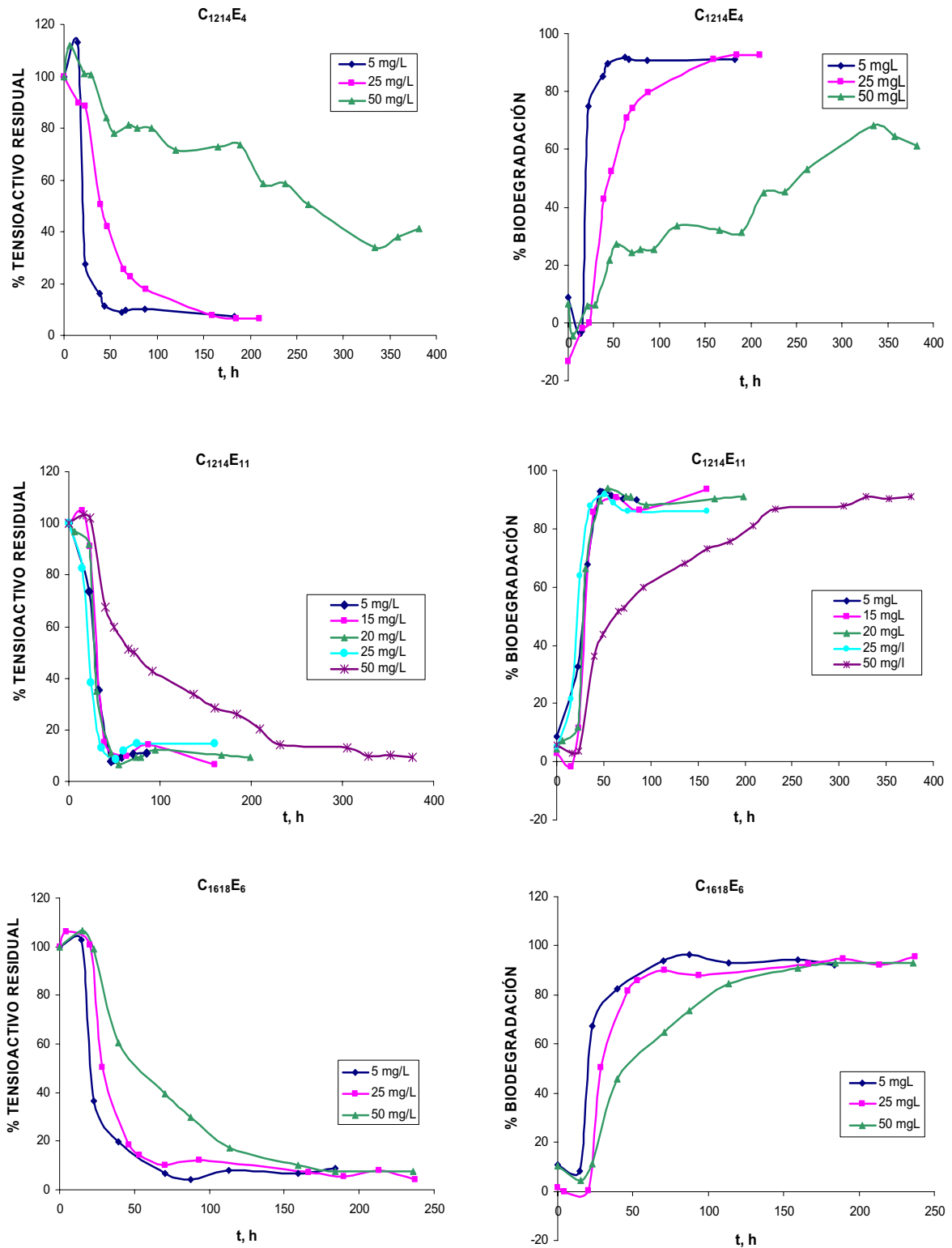


Figura V. 17.- Influencia de la concentración de tensioactivo durante el proceso de biodegradación: evolución del porcentaje de tensioactivo residual y el porcentaje de biodegradación en función del tiempo para diferentes AGE

En un análisis preliminar de los perfiles de biodegradación primaria (Figura V. 17) se observa, para todos los tensioactivos ensayados, que a bajas concentraciones iniciales de ensayo (inferiores a 25 mg/L), la concentración de tensioactivo residual disminuye rápidamente con el tiempo de biodegradación. Para concentraciones superiores, después de un período de adaptación para los microorganismos, la concentración de tensioactivo disminuye exponencialmente y la velocidad de biodegradación se hace mucho mas lenta para todos los tensioactivos ensayados, siendo este efecto mas acusado para el tensioactivo de menor número de moles de óxido de etileno de los ensayados, C₁₂₋₁₄E₄.

5.2.3. PARÁMETROS CARACTERÍSTICOS DEL PROCESO DE BIODEGRADACIÓN

A fin de poder comparar los diferentes ensayos de biodegradación se han definido una serie de parámetros característicos para los perfiles de biodegradación.

El tiempo de latencia (t_L) es el tiempo que tardan en aclimatarse los microorganismos no adaptados al nuevo sustrato; suele corresponder con el periodo de tiempo durante el cual se produce un cambio suave de la concentración residual. Para cada ensayo de biodegradabilidad se calcula trazando dos tangentes a la curva de biodegradación para las etapas de adaptación y biodegradación (Figura V. 18). El tiempo de latencia es el punto de corte de ambas rectas.

El período de latencia o aclimatación previo al proceso biodegradativo de compuestos orgánicos en el medio acuático puede tener varias causas tales como la falta de nutrientes, la inducción enzimática, predación por protozoos, mutación de especies, el crecimiento de una población microbiana capaz de metabolizar el sustrato, o simplemente la adaptación a la presencia de agentes tóxicos (Wiggins, 1987; 1988a; 1988b).

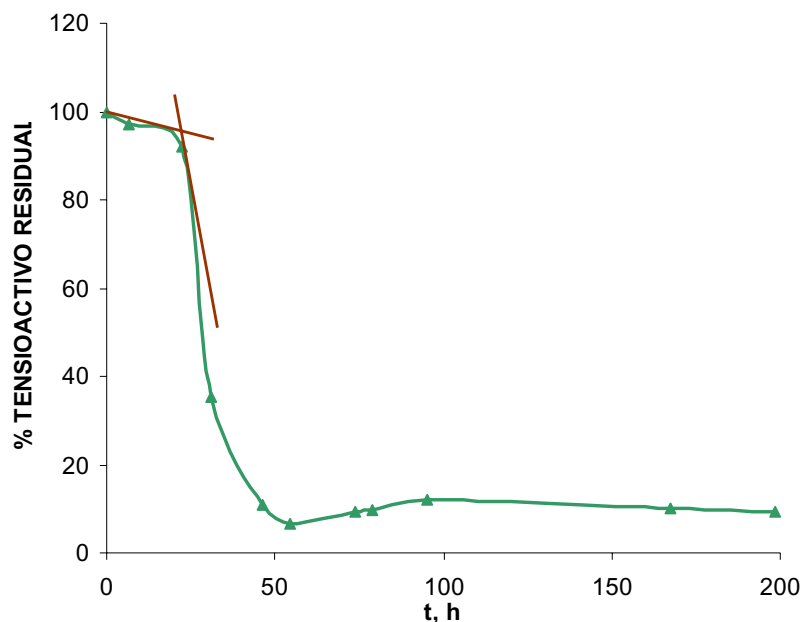


Figura V. 18.- Determinación gráfica del tiempo de latencia sobre la curva de biodegradación

El tiempo de vida media ($t_{1/2}$) es el tiempo para el cual la concentración de sustrato disminuye a la mitad desde el inicio del proceso de biodegradación, por lo tanto también se contabiliza el tiempo de latencia. Al igual que el tiempo de latencia, el tiempo de vida media se calcula mediante métodos gráficos sobre la curva de biodegradación.

La velocidad media de biodegradación (V_M) se ha calculado como el cociente entre un porcentaje de biodegradación alcanzado y el tiempo transcurrido para alcanzar ese valor de biodegradación. Para que los datos procedentes de los diferentes ensayos sean comparables entre sí, se ha fijado un valor de biodegradación del 85% y se ha medido el tiempo que tarda en alcanzarse dicho valor de biodegradación. Este parámetro puede dar idea de la rapidez con la que está transcurriendo el proceso de biodegradación, además esta velocidad media por unidad de tiempo permite comparar todos los ensayos.

La concentración de tensioactivo residual (S_R) es la concentración que no ha sido degradada por los microorganismos, y representa la concentración de tensioactivo que no es metabolizable. Se calcula como el valor medio de la concentración de tensioactivo al final del ensayo cuando ésta permanece prácticamente constante con el tiempo de biodegradación.

La biodegradabilidad del tensioactivo (B) se define como el porcentaje de tensioactivo biodegradado a las 50 horas del ensayo.

En la Tabla V. 15 se muestran los parámetros característicos de los perfiles de biodegradación para todos los tensioactivos y a todas las concentraciones ensayadas. S_0 es la concentración inicial del ensayo de biodegradación en mg/L y t_T el tiempo total de duración del ensayo en horas.

Tabla V. 15.- Parámetros característicos de los perfiles de biodegradación para los AGE

C₁₀E₃						
S₀, mg/L	t_T, h	B, %	t_L, h	t_{1/2}, h	V_M, %/h	S_R, mg/L
5	157.00	77	37.00	50.43	1.49	0.17
C₁₀E₆						
S₀, mg/L	t_T, h	B, %	t_L, h	t_{1/2}, h	V_M, %/h	S_R, mg/L
5	190.50	83	9.00	19.14	1.63	0.30
C₁₂₋₁₄E₄						
S₀, mg/L	t_T, h	B, %	t_L, h	t_{1/2}, h	V_M, %/h	S_R, mg/L
5	182.50	91	14.50	19.29	2.23	0.33
25	209.50	56	23.79	40.91	0.73	1.83
50	381.75	26	27.21	55.43	0.20	19.29
C₁₂₋₁₄E₁₁						
S₀, mg/L	t_T, h	B, %	t_L, h	t_{1/2}, h	V_M, %/h	S_R, mg/L
5	85.00	94	22.51	26.20	2.07	0.50
15	159.00	92	22.28	30.75	2.17	0.96
20	167.50	92	22.52	27.68	2.02	1.76
25	160.00	91	15.00	19.71	2.42	3.52
50	376.50	44	24.28	54.02	0.37	4.45
C₁₆₋₁₈E₆						
S₀, mg/L	t_T, h	B, %	t_L, h	t_{1/2}, h	V_M, %/h	S_R, mg/L
5	183.91	87.5	14.74	21.13	1.93	0.40
25	237.50	85	20.37	28.54	1.66	1.08
50	236.00	54	21.64	54.92	0.78	3.46
C₁₆₋₁₈E₁₁						
S₀, mg/L	t_T, h	B, %	t_L, h	t_{1/2}, h	V_M, %/h	S_R, mg/L
5	239.50	88	29.71	39.42	1.80	0.45

En la Figura V. 19 se representa el efecto de la concentración sobre el tiempo de latencia para los tensioactivos ensayados y a las concentraciones de 5, 15, 20, 25 y 50 mg/L.

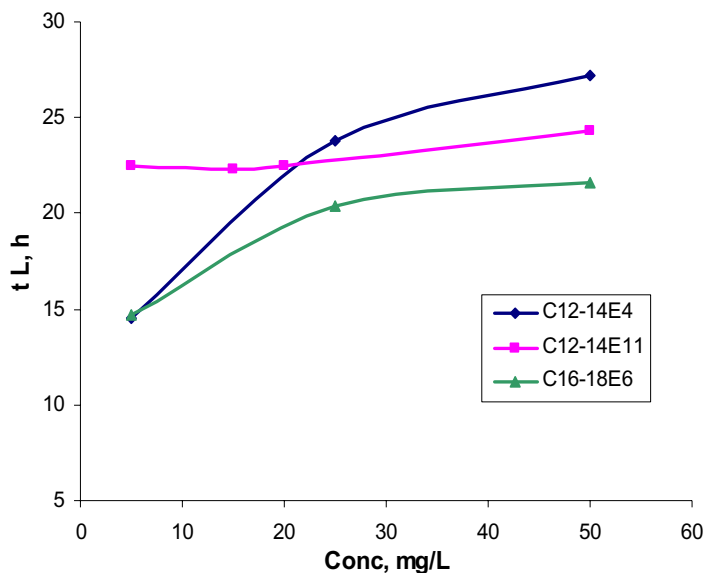


Figura V. 19.- Efecto de la concentración sobre el tiempo de latencia para diferentes AGE

Por otra parte se observa que a bajas concentraciones iniciales de tensioactivo (5 mg/L), el tiempo de latencia aumenta con el número de moles de OE de la molécula y el peso molecular medio del tensioactivo. Estos resultados están de acuerdo con datos encontrados en bibliografía que ponen de manifiesto que cadenas etoxiladas de mayor tamaño muestran un aumento de la biorresistencia (Patterson, 1970; Karsa, 1995). Este efecto puede deberse al aumento de la hidrofiliicidad y a que un aumento en las dimensiones moleculares limita el transporte de la moléculas a través de las paredes celulares (Swisher, 1987).

Sin embargo, cuando la concentración de tensioactivo es elevada (25 y 50 mg/L) se observa una disminución del tiempo de latencia con el aumento del número de moles de OE y con el PM, es decir, para moléculas de tensioactivo de alto peso molecular y tamaños de cadena etoxilada mayores el proceso de biodegradación se acelera, y esto ocurre para concentraciones de tensioactivo mayores a 25 mg/L.

Este hecho se comprueba al representar la velocidad media de biodegradación frente al número de moles de óxido de etileno. De igual forma se observa que para concentraciones de ensayo elevadas la velocidad de biodegradación aumenta al hacerlo el

tamaño de la cadena etoxilada. Para 5 mg/L el efecto de la influencia del número de moles de OE sobre la velocidad media de biodegradación es menos acusado (Figura V. 20).

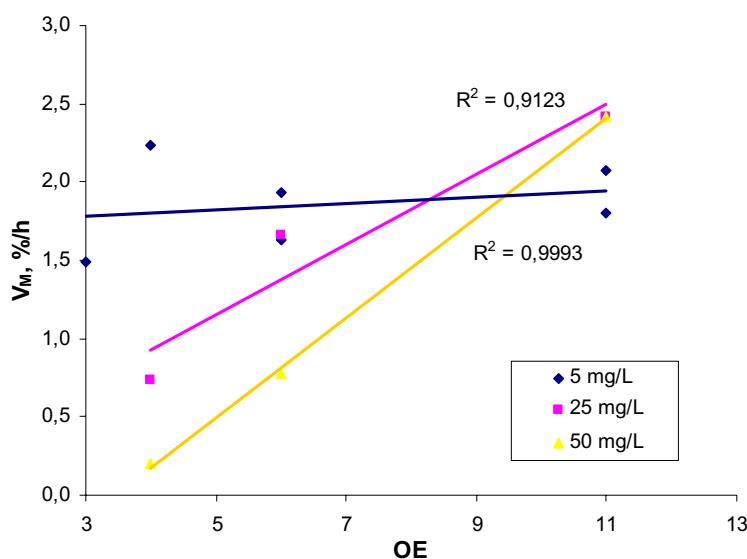


Figura V. 20.- Variación de la velocidad media de biodegradación frente al número de moles de OE a diferentes concentraciones iniciales

Teniendo en cuenta el mecanismo de división central propuesto para la biodegradación de alcoholes etoxilados lineales (Marcomini, 2000), que conduce a la formación de polietilenglicol con la misma longitud que la cadena etoxilada, alcoholes grasos y posteriormente ácidos grasos resultantes del resto alquílico (Figura V. 21):

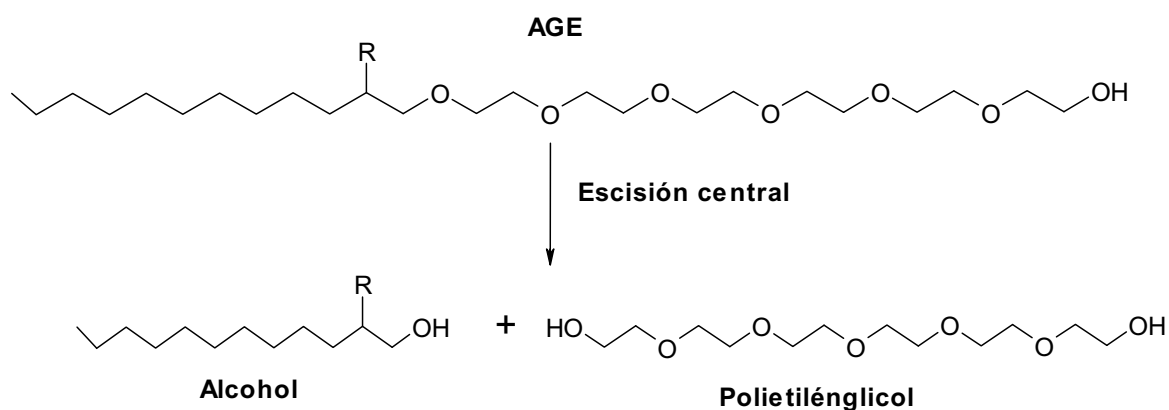


Figura V. 21.- Mecanismo simplificado de biodegradación de alcoholes grasos etoxilados

y teniendo en cuenta que la velocidad de biodegradación parece ser mayor cuanto mayor es el número de moles de OE de la cadena etoxilada (Figura V. 20) y que este efecto

es más acusado cuanto mayor es la concentración inicial de tensioactivo, los resultados obtenidos sugieren que cuanto menor es la longitud de las cadenas etoxiladas liberadas en el proceso de biodegradación más acusado es el efecto inhibitor ejercido sobre los microorganismos responsables del proceso biodegradativo.

El término HLB representa una medida de la afinidad relativa del tensioactivo para las fases agua (W) y aceite (O). El HLB depende esencialmente del tensioactivo. Se mide en escala 0 a 20, según la importancia relativa del grupo hidrofílico y del grupo lipofílico en la molécula del tensioactivo. El valor de este parámetro adimensional determina alguna de las propiedades características de los tensioactivos (Tabla V. 16).

El HLB ha sido y es todavía una escala muy usada en la práctica, probablemente por su extrema simplicidad y también porque suministra un excelente método de comparación entre sistemas semejantes, por ejemplo con tensioactivos de la misma familia.

Tabla V. 16.- Relación entre el HLB de los tensioactivos y sus aplicaciones

Solubilidad en agua	HLB	Descripción
Insoluble	3 – 6	Emulsionante W/O (agua en aceite)
Disipado pobremente (apariencia lechosa)	7 – 9	Humectantes
Transición a claro	8 – 18	Emulsionantes O/W (aceite en agua)
Soluble	13 – 15	Detergentes
	15 – 18	Solubilizantes

En la Figura V. 22 se representa la biodegradabilidad de los AGE estudiados frente al HLB a las concentraciones iniciales de de 5, 25 y 50 mg/L. Como se aprecia la biodegradabilidad aumenta con el HLB del tensioactivo. El AGE C₁₂₋₁₄E₁₁, tensioactivo de mayor HLB, es el que presenta mayor biodegradabilidad.

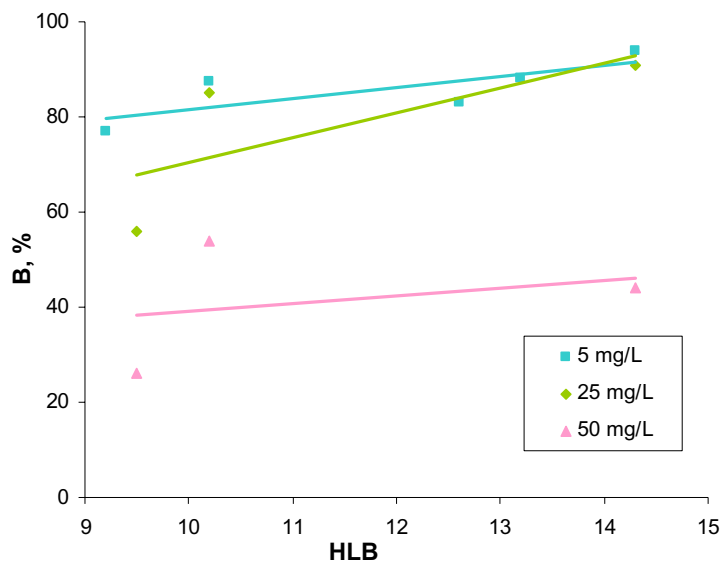


Figura V. 22.- Biodegradabilidad de los AGE frente al HLB a diferentes concentraciones iniciales

En la Figura V. 23 aparecen representados los parámetros característicos ($t_{1/2}$, V_M , B y S_R) de los perfiles de biodegradación en función de la concentración inicial de ensayo para los tensioactivos $C_{12-14}E_4$, $C_{12-14}E_{11}$ y $C_{16-18}E_6$.

Los parámetros $t_{1/2}$ y V_M son los que están relacionados con la velocidad del proceso de biodegradación. Se observa que el tiempo de vida media aumenta ligeramente con la concentración de tensioactivo hasta 25 mg/L, en cambio para 50 mg/L ese efecto es más acusado. De la misma forma la velocidad media de biodegradación disminuye con la concentración inicial de ensayo, es decir, se confirma que al aumentar la concentración de tensioactivo se está produciendo una ralentización del proceso de biodegradación. Este descenso de la velocidad media de biodegradación puede deberse a un efecto de autoinhibición de la biodegradación por efecto bacteriostático del sustrato.

Por otra parte, a medida que aumenta la concentración inicial de tensioactivo en el ensayo se produce un aumento lógico de la concentración residual como muestra la Figura V. 23. Este efecto puede tener su origen en que no se completa la biodegradación primaria debido a una inhibición de los microorganismos. La población de microorganismos inicial da paso a otra más especializada en la biodegradación de metabolitos.

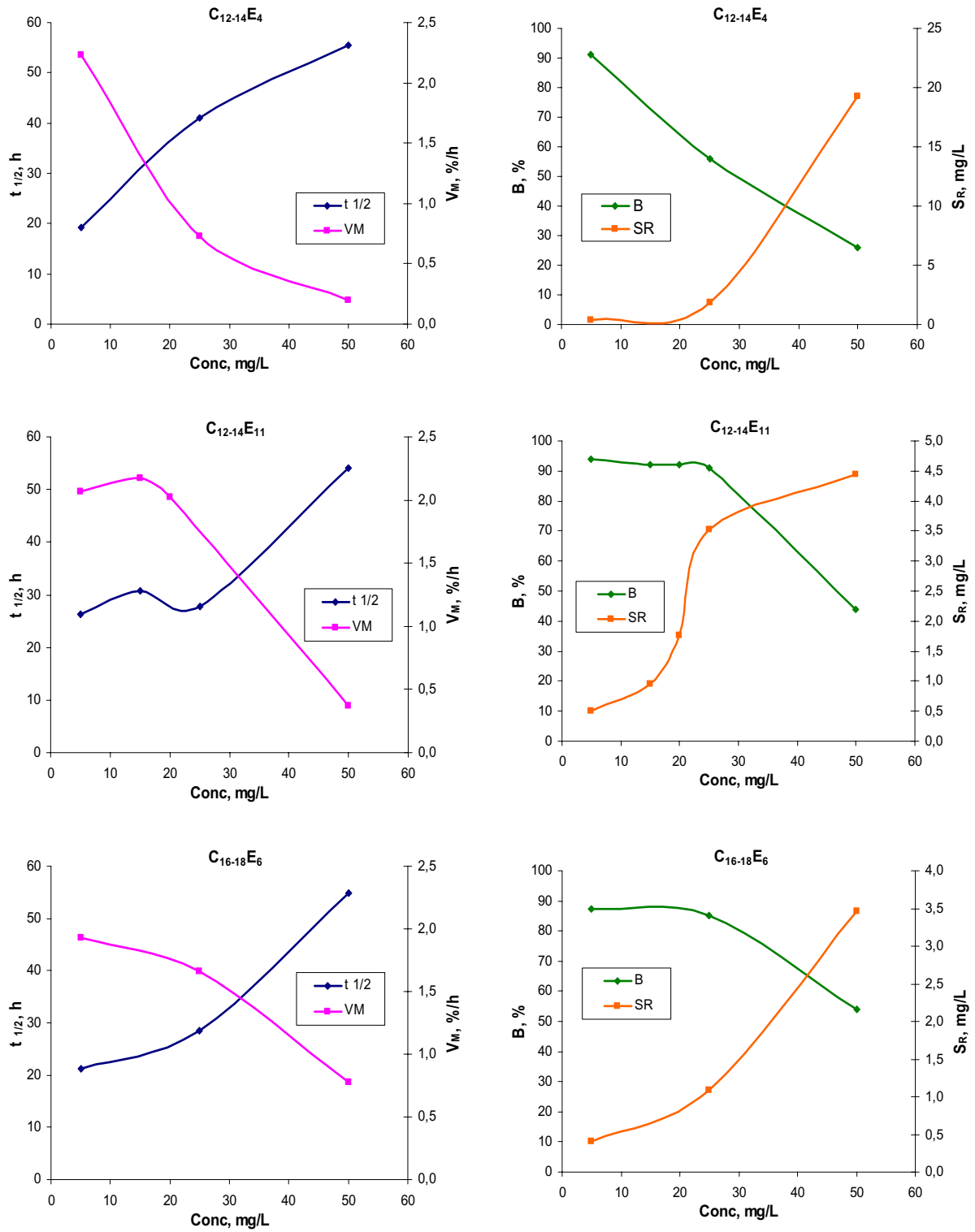
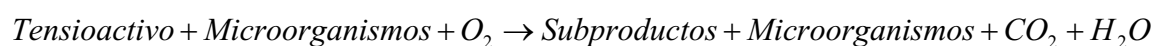


Figura V. 23.- Variación de los parámetros característicos de los perfiles de biodegradación para los AGE con la concentración inicial de materia tensioactiva

Los parámetros característicos del proceso de biodegradación definidos y calculados como se ha descrito: tiempo de latencia, tiempo de vida media, velocidad media de biodegradación, concentración residual y biodegradabilidad, han permitido cuantificar los resultados obtenidos y analizar la influencia de diferentes parámetros como el número de moles de OE y el HLB sobre la biodegradabilidad de AGE.

5.2.4. CRECIMIENTO DE LA BIOMASA DURANTE EL PROCESO DE BIODEGRADACIÓN

Durante el proceso de biodegradación primaria los microorganismos actúan sobre el tensioactivo, que es la única fuente de carbono presente en el medio, y lo transforman de acuerdo con la siguiente reacción:



Es decir, los microorganismos actúan sobre la molécula de tensioactivo, la rompen y la transforman en biomasa y en subproductos de degradación con desprendimiento de CO₂.

Las curvas de crecimiento de microorganismos son un método alternativo para evaluar la biodegradabilidad total o última de los tensioactivos cuando estos son la única fuente de carbono en el medio de cultivo.

Durante el ensayo de biodegradabilidad se ha utilizado como inóculo una población aireada y mixta de microorganismos no adaptados procedentes de una EDAR que opera con aguas residuales urbanas.

Las curvas de crecimiento se obtuvieron simultáneamente a los perfiles de biodegradación primaria de acuerdo con el procedimiento descrito en el apartado 3.4.2. La concentración de microorganismos se expresa como unidades formadoras de colonias por ml (UFC/ml).

Las curvas de crecimiento presentan cuatro fases más o menos diferenciadas que se corresponden con las fases de crecimiento microbiano en reactores discontinuos:

1. Fase de retardo a aclimatación, que algunos autores definen como el tiempo durante el cual se consume menos del 10% del sustrato inicial

presente en el ensayo de biodegradabilidad. En esta fase de aclimatación apenas existe crecimiento de la población microbiana.

2. Fase de crecimiento exponencial durante el cual la célula se divide a una velocidad determinada por su tiempo de generación y su capacidad de procesar el sustrato.
3. Fase estacionaria en la que la población: a) ha agotado el sustrato o nutrientes necesarios para su crecimiento, b) existe un equilibrio entre crecimiento y muerte de células.
4. Fase de muerte o crecimiento decreciente. La concentración de sustrato disponible es muy baja y los microorganismos se ven forzados a metabolizar su propio protoplasma sin reposición del mismo. La tasa de muerte de microorganismos excede de la población de células nuevas.

En la Figura V. 24 se recogen las curvas de crecimiento para cada uno de los tensioactivos y a las concentraciones ensayadas.

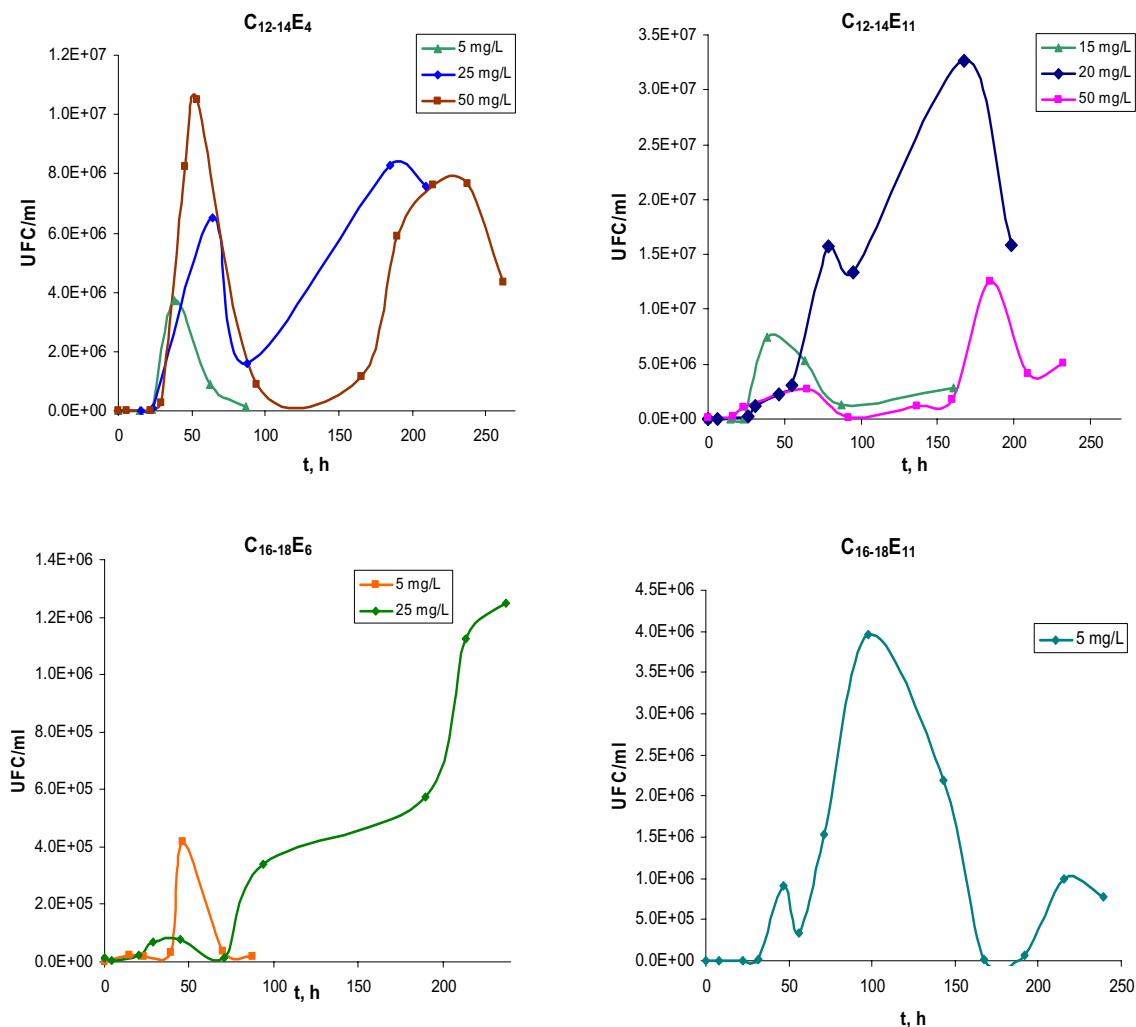


Figura V. 24.- Evolución del número de UFC/ml durante los ensayos de biodegradación para los tensioactivos AGE estudiados a diferentes concentraciones iniciales

Para estudiar la influencia del grado de etoxilación y del tamaño de la cadena carbonada sobre las curvas de crecimiento de microorganismos, se comparan las curvas de los diferentes AGE a las concentraciones iniciales de 5, 25 y 50 mg/L (Figura V. 25). Se observa que se obtienen valores mayores de UFC/ml cuando la longitud de la cadena carbonada y el grado de etoxilación es mayor.

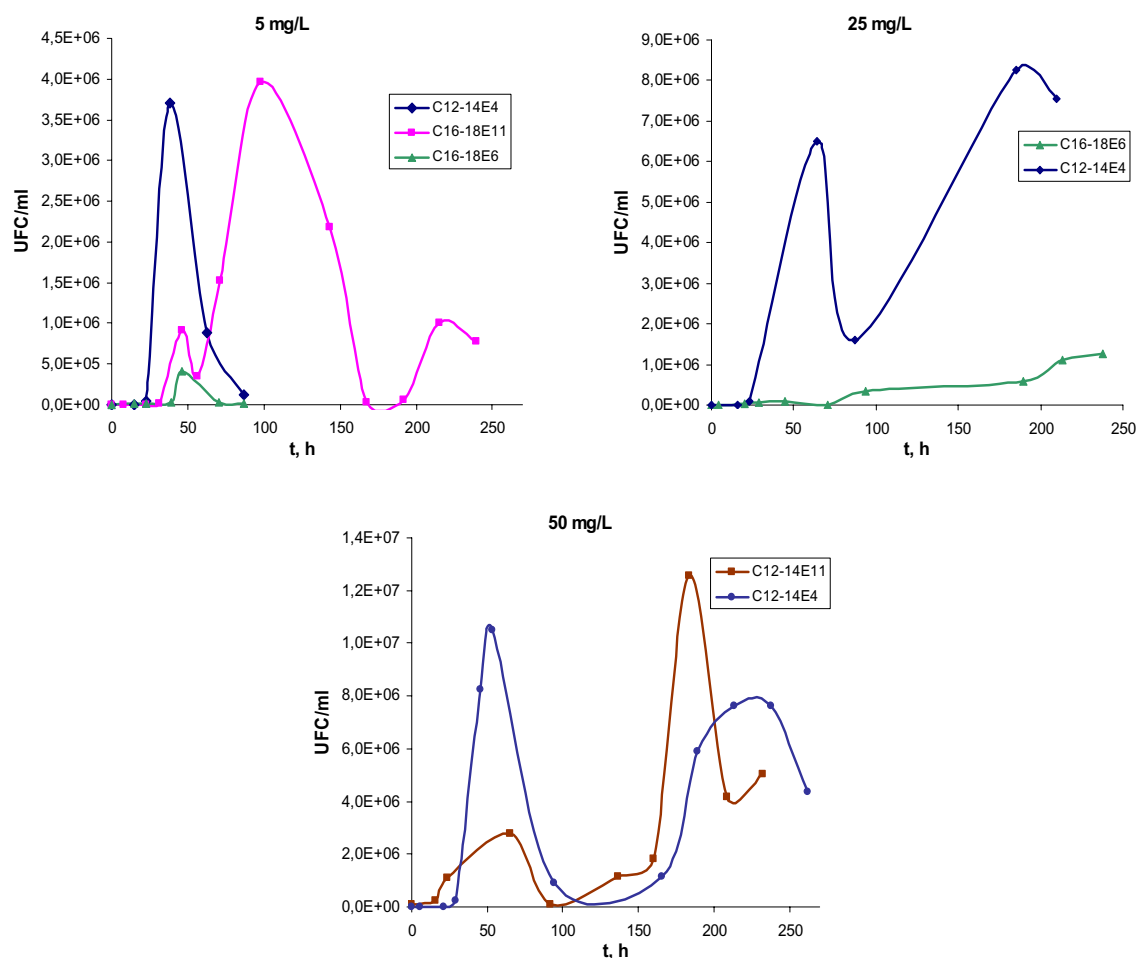


Figura V. 25.- Influencia del grado de etoxilación y el tamaño de la cadena carbonada sobre las curvas de crecimiento de biomasa para diferentes AGE ensayados a la concentraciones iniciales de 5, 25 y 50 mg/L

En la Figura V. 26, Figura V. 27, Figura V. 28 y Figura V. 29 se representan las curvas de crecimiento junto con los perfiles de biodegradación primaria correspondientes. Se observa que las formas de las curvas de biodegradación se justifican mediante las curvas de crecimiento de microorganismos.

Durante la fase de crecimiento exponencial de los microorganismos se produce una disminución lineal en la concentración residual de tensioactivo, cuando la concentración de tensioactivo permanece constante se observa que no hay crecimiento de los microorganismos. Finalmente para concentraciones de sustrato superiores a 5 mg/L se observan curvas de crecimiento bifásicas con dos picos en las curvas de crecimiento, sugiriendo así inhibición de los microorganismos existentes inicialmente en el ensayo y

crecimiento de nuevas poblaciones debido a la biodegradación de los subproductos de biodegradación.

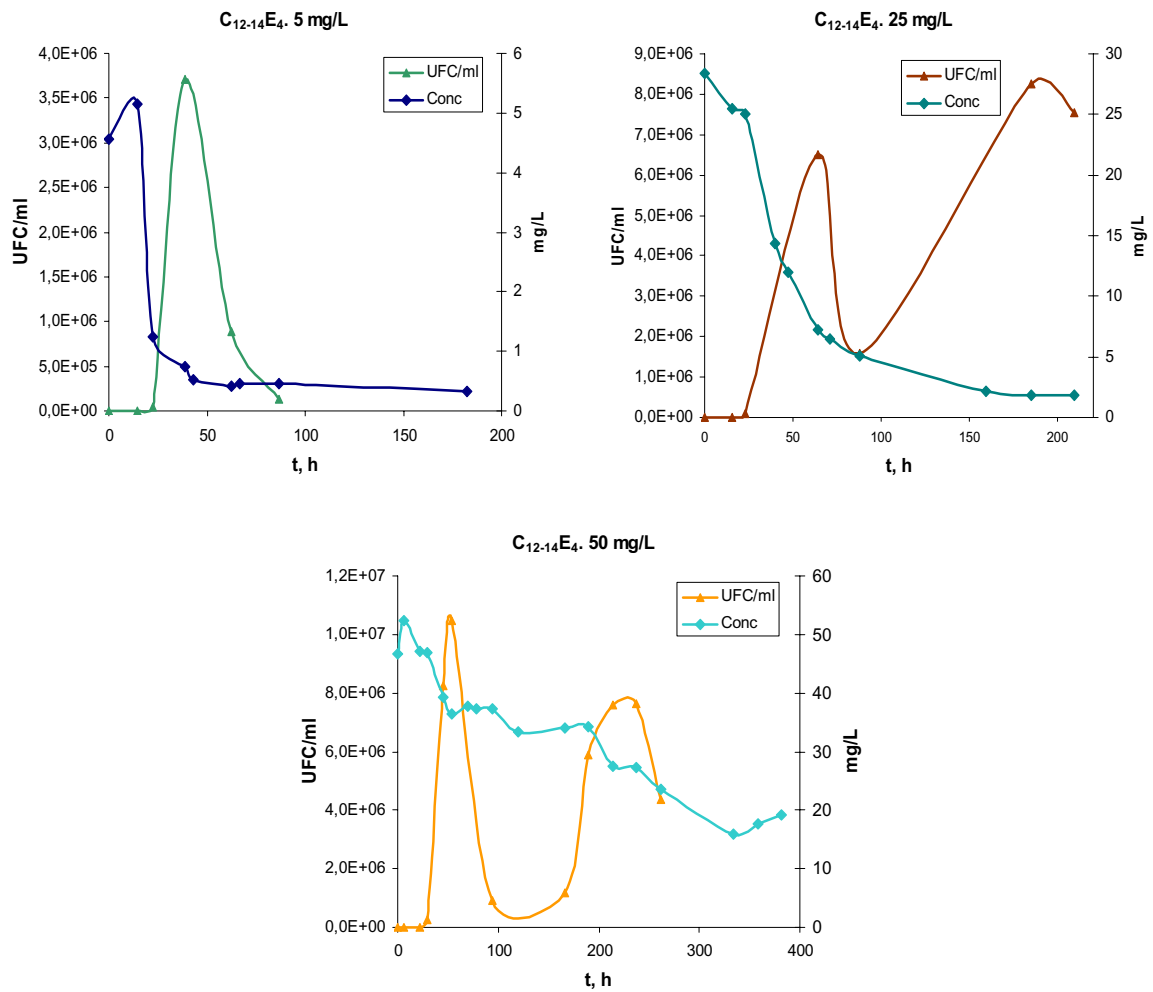


Figura V. 26.- Curvas de crecimiento y perfiles de biodegradación para el tensioactivo $C_{12-14}E_4$ a 5, 25 y 50 mg/L

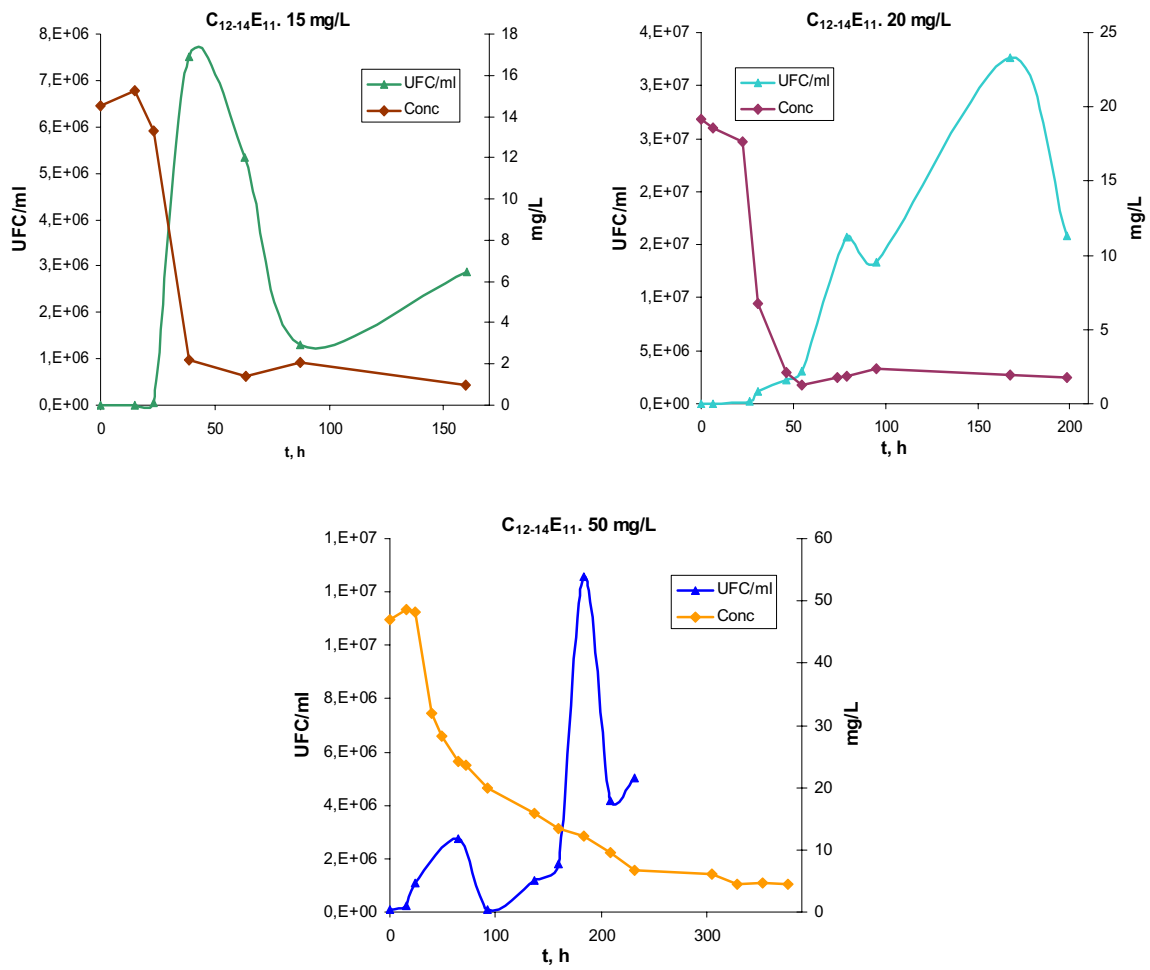


Figura V. 27.- Curvas de crecimiento y perfiles de biodegradación primaria para el tensioactivo C₁₂₋₁₄E₁₁ a 15, 20 y 50 mg/L

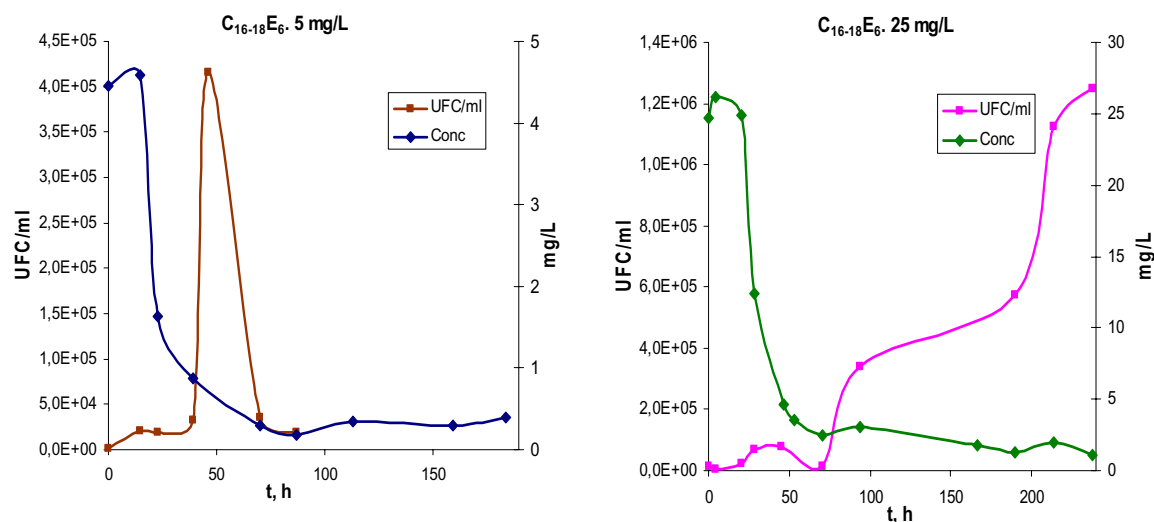


Figura V. 28.- Curvas de crecimiento y perfiles de biodegradación primaria para el tensioactivo C₁₆₋₁₈E₆ a 5 y 25 mg/L

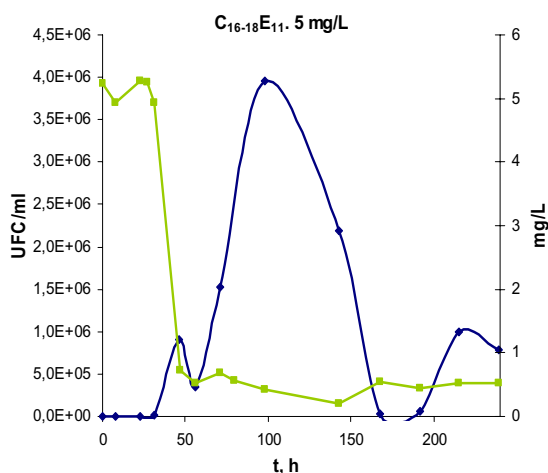


Figura V. 29.- Curva de crecimiento y perfil de biodegradación primaria para el tensioactivo C₁₆₋₁₈E₁₁ a 5 mg/L

5.2.5. PARÁMETROS CARACTERÍSTICOS DE LAS CURVAS DE CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS

En la Tabla V. 17 se muestran los parámetros característicos de las curvas de crecimiento durante el proceso de biodegradación: X_0 es el valor inicial de UFC/ml obtenido en el ensayo; UFC/ml_{max} representa el valor máximo de UFC/ml que aparecen en la primera fase de crecimiento exponencial (primer pico). UFC/ml_{max} aumenta con la

concentración cuando el número de moles de OE de la molécula de tensioactivo es bajo, para número de moles de OE mayor el crecimiento se inhibe con la concentración, aparecen nuevas unidades formadoras de colonias responsables de la degradación de los metabolitos de biodegradación.

El crecimiento microbiano durante la fase primaria de crecimiento exponencial puede describirse mediante la ecuación de Monod según la siguiente ecuación:

$$\frac{dX}{dt} = k \cdot x$$

Ecuación V. 14

o en su forma integrada:

$$X = X_0 \cdot \exp(k \cdot t)$$

Ecuación V. 15

Donde k representa la velocidad específica de crecimiento en h^{-1} , X la concentración de biomasa en cada instante expresada como UFC/ml, y X_0 la concentración de biomasa al inicio del ensayo.

Mediante regresión no lineal se ha determinado la velocidad específica de crecimiento para los cuatro AGE ensayados. Se observa que para cada tensioactivo k disminuye con la concentración inicial del ensayo (Figura V. 30, Tabla V. 17) debido a un efecto de inhibición de los microorganismos.

También se ha calculado el parámetro Y_{ap} (Tabla V. 17) que representa el rendimiento de producción de biomasa, es decir: la proporción de sustrato original convertido en biomasa, el cual se asume constante a lo largo del proceso de biodegradación. A partir de los perfiles de biodegradación del sustrato y de las curvas de crecimiento se calcula Y_{ap} como el cociente $\Delta X/\Delta S$, donde ΔX es la cantidad de microorganismos formados durante la fase de crecimiento exponencial y ΔS la cantidad de sustrato consumido durante el mismo período de tiempo.

Tabla V. 17.- Parámetros característicos de las curvas de crecimiento de biomasa para AGE

C₁₂₋₁₄E₄				
S₀, mg/L	X₀, UFC/ml	UFC/ml_{max}	k, h⁻¹	Y_{ap}, UFC/g sustrato
5	2.05·10 ³	3.71·10 ⁶	0.271	9.01·10 ⁵
25	2.65·10 ²	6.50·10 ⁶	0.155	5.43·10 ⁵
50	2.95·10 ²	1.05·10 ⁷	0.162	8.84·10 ⁵
C₁₂₋₁₄E₁₁				
S₀, mg/L	X₀, UFC/ml	UFC/ml_{max}	k, h⁻¹	Y_{ap}, UFC/g sustrato
15	4.30·10 ³	7.50·10 ⁶	0.207	6.13·10 ⁵
20	4.98·10 ²	1.57·10 ⁷	0.116	9.71·10 ⁵
50	8.02·10 ⁴	2.77·10 ⁶	0.052	1.11·10 ⁵
C₁₆₋₁₈E₆				
S₀, mg/L	X₀, UFC/ml	UFC/ml_{max}	k, h⁻¹	Y_{ap}, UFC/g sustrato
5	1.75·10 ³	4.17·10 ⁵	0.076	9.82·10 ³
25	1.50·10 ⁴	3.40·10 ⁵	0.020	6.25·10 ⁴
C₁₆₋₁₈E₁₁				
S₀, mg/L	X₀, UFC/ml	UFC/ml_{max}	k, h⁻¹	Y_{ap}, UFC/g sustrato
5	1.04·10 ⁴	3.96·10 ⁶	0.080	7.69·10 ⁵

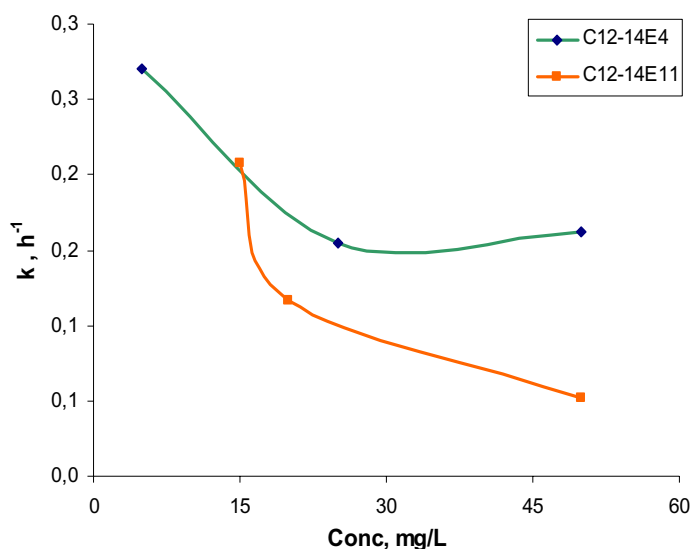


Figura V. 30.- Variación de la velocidad específica de crecimiento con la concentración inicial de ensayo para los AGE C₁₂₋₁₄E₄ y C₁₂₋₁₄E₁₁

5.2.6. ESTUDIO CINÉTICO DE LA BIODEGRADACIÓN PRIMARIA DE LOS AGE

Los métodos estándar utilizados en el estudio de la biodegradabilidad de tensioactivos son útiles para indicar si un producto es o no biodegradable pero no son útiles para poder predecir la velocidad con que un determinado producto se biodegrada en el medio ambiente. La necesidad de plantear expresiones que describan la velocidad de biodegradación en un medio acuático hace que se desarrollen modelos que permitan predecir el comportamiento de productos difícilmente biodegradables en distintas condiciones ambientales.

La cinética de biodegradación de un compuesto orgánico por una población de microorganismos o poblaciones mezcladas de los mismos, depende de si este compuesto soporta el crecimiento de los microorganismos, es decir, es su fuente de carbono y energía principal o si no lo es, por lo que se pueden plantear diferentes modelos cinéticos: modelos para la biodegradación de sustratos que no soportan el crecimiento de microorganismos y modelos cinéticos para la biodegradación de sustratos que soportan el crecimiento de microorganismos, estos modelos se presentan y discuten en los siguientes apartados.

5.2.6.1. Modelos cinéticos para la biodegradación de un sustrato que no soporta el crecimiento de los microorganismos

Para establecer modelos de biodegradación de compuestos, que no contribuyen apreciablemente al crecimiento de los organismos responsables, se necesitan expresiones que describan el crecimiento de esos organismos, ya que, en general, las velocidades de crecimiento de éstos y de desaparición del compuesto orgánico son independientes. Schmidt y col. (Schmidt, 1985) expresan la velocidad de biodegradación del sustrato mediante una cinética de saturación utilizando la ecuación de Michaelis-Menten:

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{r_{\max} S}{K_M + S} X$$

Ecuación V. 16

y la velocidad de crecimiento mediante la ecuación logística:

$$\frac{dX}{dt} = kX \left(1 - \frac{X}{X_{\max}} \right)$$

Ecuación V. 17

donde X representa la concentración de biomasa y S la concentración del compuesto orgánico biodegradado.

Integrando esta última ecuación resulta:

$$X = \frac{X_{\max}}{1 + \frac{X_{\max} - X_0}{X_0} \exp(-kt)}$$

Ecuación V. 18

La ecuación logística se simplifica a crecimiento exponencial cuando la concentración de biomasa es mucho más pequeña que la máxima permitida:

$$\frac{dX}{dt} \approx kX \quad X = X_0 \exp(kt)$$

Ecuación V. 19

Y a crecimiento cero cuando la concentración de biomasa es prácticamente la máxima permitida:

$$\frac{dX}{dt} \approx 0 \quad X = X_{\max}$$

Ecuación V. 20

y en la zona intermedia la ecuación logística se aproxima a crecimiento lineal con una pendiente aproximadamente igual a su pendiente en el punto de inflexión.

La localización del punto de inflexión se puede realizar igualando a cero la segunda derivada de la Ecuación V. 17:

$$\begin{aligned}\frac{d^2 X}{dt^2} &= \left(k \left(1 - \frac{X}{X_{\max}} \right) - \frac{kX}{X_{\max}} \right) \frac{dX}{dt} \\ k \left(1 - \frac{X_i}{X_{\max}} \right) - \frac{kX_i}{X_{\max}} &= k - \frac{2kX_i}{X_{\max}} = 0 \quad X_i = \frac{X_{\max}}{2} \\ \left(\frac{dX}{dt} \right)_i &= k \frac{X_{\max}}{2} \left(1 - \frac{1}{2} \right) = \frac{kX_{\max}}{4}\end{aligned}$$

el tiempo correspondiente al punto de inflexión:

$$\begin{aligned}\ln \left(\frac{X(X_{\max} - X_0)}{X_0(X_{\max} - X)} \right) &= \ln \left(\frac{X_{\max} - X_0}{X_0} \right) = kt_i \\ t_i &= \frac{\ln \left(\frac{X_{\max} - X_0}{X_0} \right)}{k}\end{aligned}$$

Ecuación V. 21

la recta que con esa pendiente pasa por este punto:

$$X = \frac{kX_{\max}}{4} t - \left(\frac{1}{4} \ln \left(\frac{X_{\max} - X_0}{X_0} \right) - \frac{1}{2} \right) X_{\max}$$

Ecuación V. 22

Si tenemos en cuenta la Ecuación V. 18 y la sustituimos en la Ecuación V. 16, que expresa la variación de la concentración de tensioactivo en función del tiempo, se obtiene:

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{r_{\max} S}{K_M + S} \frac{X_{\max}}{1 + \frac{X_{\max} - X_0}{X_0} \exp(-kt)}$$

Ecuación V. 23

separando variables e integrando resulta:

$$K_M \ln\left(\frac{S_0}{S}\right) + S_0 - S = \frac{r_{\max} X_{\max}}{k} \ln\left(\frac{X_0}{X_{\max}} (\exp(kt) - 1) + 1\right)$$

Ecuación V. 24

e introduciendo la conversión de acuerdo con:

$$S = S_0(1 - x)$$

Ecuación V. 25

queda:

$$-\beta_M \ln(1 - x) + x = \beta_X \ln(\alpha_0 (\exp(kt) - 1) + 1)$$

Ecuación V. 26

donde:

$$\beta_M = \frac{K_M}{S_0} \quad \beta_X = \frac{r_{\max} X_{\max}}{k S_0} \quad \alpha_0 = \frac{X_0}{X_{\max}}$$

Ecuación V. 27

ecuación que para $K_M \gg S_0$ se reduce a:

$$x = 1 - \left(\alpha_0 (\exp(kt) - 1) + 1 \right)^{-\beta_X / \beta_M}$$

Ecuación V. 28

y para $K_M \ll S_0$ se reduce a:

$$x = \beta_X \ln \left(\alpha_0 (\exp(kt) - 1) + 1 \right)$$

Ecuación V. 29

En la Tabla V. 18 se recogen las expresiones correspondientes a los modelos que tienen en cuenta la biodegradación de un sustrato que no soporta el crecimiento de los microorganismos y que no tienen en cuenta una concentración de sustrato no biodegradable, modelos propuestos por Schmidt y col. (Schmidt, 1985).

Tabla V. 18.- Modelos propuestos por Schmidt y col. (Schmidt, 1985) para sustratos que no soportan el crecimiento de microorganismos sin considerar una concentración residual no biodegradable

CONDICIONES	MODELO CINÉTICO
Ecuación logística para la biomasa y Michaelis Menten para el sustrato	$-\beta_M \ln(1 - x) + x = \beta_X \ln \left(\alpha_0 (\exp(kt) - 1) + 1 \right)$
Ecuación logística para la biomasa y primer orden para la biodegradación del sustrato, $K_M \gg S_0$	$x = 1 - \left(\alpha_0 (\exp(kt) - 1) + 1 \right)^{-\beta_X / \beta_M}$
Ecuación logística para la biomasa y orden cero para la biodegradación del sustrato, $K_M \ll S_0$	$x = \beta_X \ln \left(\alpha_0 (\exp(kt) - 1) + 1 \right)$

De haber una fracción del sustrato no biodegradable, S_R , bastaría modificar la Ecuación V. 23 en la forma:

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{r_{\max}(S - S_R)}{K_M + S - S_R} \frac{X_{\max}}{1 + \frac{X_{\max} - X_0}{X_0} \exp(-kt)}$$

Ecuación V. 30

separando variables e integrando:

$$K_M \ln\left(\frac{S_0 - S_R}{S - S_R}\right) + S_0 - S = \frac{r_{\max} X_{\max}}{k} \ln\left(\frac{X_0}{X_{\max}} (\exp(kt) - 1) + 1\right)$$

Ecuación V. 31

introduciendo la conversión queda:

$$\beta_M \ln\left(\frac{x_m}{x_m - x}\right) + x = \beta_X \ln\left(\alpha_0 (\exp(kt) - 1) + 1\right)$$

Ecuación V. 32

que se reduce a la Ecuación V. 26 para $x_m = 1$.

Esta es la ecuación general para el modelo de biodegradación de sustratos que no soportan el crecimiento de microorganismos y que supone un crecimiento logístico para los microorganismos teniendo en cuenta una concentración residual S_R para el sustrato.

Sin embargo, el segundo miembro de la Ecuación V. 32 también puede simplificarse si se considera no un crecimiento logístico para el crecimiento de microorganismos, sino un crecimiento exponencial, lineal o permanece constante a la concentración de biomasa máxima permitida, Ecuación V. 19, Ecuación V. 22 y Ecuación V. 20 respectivamente.

El segundo miembro de la Ecuación V. 32 se simplifica cuando la degradación del sustrato se produce simultáneamente al crecimiento exponencial de la biomasa, Ecuación V. 19:

$$\frac{r_{\max}}{S_0} \int_0^t X_0 \exp(kt) dt = \frac{r_{\max} X_0}{k S_0} (\exp(kt) - 1) = \beta_{X'} (\exp(kt) - 1)$$

Ecuación V. 33

donde

$$\beta_{X'} = \frac{r_{\max} X_0}{k S_0}$$

Ecuación V. 34

cuando la degradación del sustrato se produce simultáneamente al crecimiento lineal de la biomasa:

$$\frac{r_{\max}}{S_0} \int_0^t (X_0' + k't) dt = \frac{r_{\max}}{S_0} \left(X_0' t + \frac{k'}{2} t^2 \right) = \beta_{X1} t + \beta_{X2} t^2$$

Ecuación V. 35

y cuando la degradación del sustrato se produce a la concentración máxima de biomasa:

$$\frac{r_{\max}}{S_0} \int_0^t X_{\max} dt = \frac{r_{\max}}{S_0} X_{\max} t = \beta_{X3} t$$

Ecuación V. 36

donde

$$\beta_{X1} = \frac{r_{\max} X_0'}{S_0} \quad \beta_{X2} = \frac{r_{\max} k'}{2} \quad \beta_{X3} = \frac{r_{\max} X_{\max}}{S_0}$$

Ecuación V. 37

que combinadas con los dos casos límites de la ecuación de Michaelis-Menten, conducen a los 12 modelos de Schmidt y col. (Schmidt, 1985) corregidos para incluir la existencia de una fracción del sustrato no biodegradable, que se indican en la Tabla V. 19.

Tabla V. 19.- Modelos de Schmidt y col. (Schmidt, 1985) adaptados a una conversión máxima (ó concentración de tensioactivo residual)

CONDICIONES	ECUACIÓN CINÉTICA INTEGRADA
1) Ecuación Logística para la biomasa Michaelis-Menten para el sustrato	$\beta_M \ln \left(\frac{x_m}{x_m - x} \right) + x = \beta_X \ln \left(\alpha_0 (\exp(kt) - 1) + 1 \right)$
2) Ecuación Logística para la biomasa Primer orden para el sustrato	$\beta_M \ln \left(\frac{x_m}{x_m - x} \right) = \beta_X \ln \left(\alpha_0 (\exp(kt) - 1) + 1 \right)$
3) Ecuación Logística para la biomasa Orden cero para el sustrato	$x = \beta_X \ln \left(\alpha_0 (\exp(kt) - 1) + 1 \right)$
4) Crecimiento Exponencial para la biomasa Michaelis-Menten para el sustrato	$\beta_M \ln \left(\frac{x_m}{x_m - x} \right) + x = \beta_X' (\exp(kt) - 1)$
5) Crecimiento Exponencial para la biomasa Primer orden para el sustrato	$\beta_M \ln \left(\frac{x_m}{x_m - x} \right) = \beta_X' (\exp(kt) - 1)$
6) Crecimiento Exponencial para la biomasa Orden cero para el sustrato	$x = \beta_X' (\exp(kt) - 1)$
7) Crecimiento Lineal para la biomasa Michaelis-Menten para el sustrato	$\beta_M \ln \left(\frac{x_m}{x_m - x} \right) + x = \beta_{X1}t + \beta_{X2}t^2$
8) Crecimiento Lineal para la biomasa Primer orden para el sustrato	$\beta_M \ln \left(\frac{x_m}{x_m - x} \right) = \beta_{X1}t + \beta_{X2}t^2$
9) Crecimiento Lineal para la biomasa Orden cero para el sustrato	$x = \beta_{X1}t + \beta_{X2}t^2$
10) Concentración máxima de biomasa Michaelis-Menten para el sustrato	$\beta_M \ln \left(\frac{x_m}{x_m - x} \right) + x = \beta_{X3}t$
11) Concentración máxima de biomasa Primer orden para el sustrato	$\beta_M \ln \left(\frac{x_m}{x_m - x} \right) = \beta_{X3}t$
12) Concentración máxima de biomasa Orden cero para el sustrato	$x = \beta_{X3}t$

De las todas los modelos cinéticos de la Tabla V. 19 sólo la ecuación 5 puede aplicarse de forma satisfactoria a nuestros resultados experimentales. Esta ecuación asume un crecimiento exponencial de la masa microbiana y una degradación de primer orden del tensioactivo.

En la Figura V. 31 se muestra, a título de ejemplo, para algunos de los ensayos de biodegradación de los AGE estudiados la comparación de los resultados experimentales de conversión (Ecuación V. 25) obtenidos frente a los calculados con la ecuación 5 de la Tabla V. 19. Las concentraciones más altas de tensioactivo (25 y 50 mg/L) no definen bien el perfil de biodegradación obtenido, fundamentalmente en la etapa inicial de conversión.

Los parámetros del ajuste del modelo cinético β_M , β'_X , k y x_m obtenidos para los diferentes tensioactivos están recogidos en la Tabla V. 20. También se muestra el valor de la constante K_M , obtenida teniendo en cuenta la relación:

$$\beta_M = \frac{K_M}{S_0}$$

Si el modelo es aplicable, el valor de la velocidad específica de crecimiento de los microorganismos k , y la constante de Michaelis-Menten K_M deben ser constantes con la concentración de sustrato empleada, y como K_M representa el valor de la concentración de sustrato para la cual la velocidad de biodegradación es igual a la mitad de la máxima no serían válidos valores muy altos de esta constante.

Se observa que los valores de la constante K_M varían de forma significativa con la concentración de sustrato, y se hacen negativos en algunos casos, por lo que este modelo, a pesar de que ajusta los valores experimentales encontrados, no explica el comportamiento de la biodegradación de los tensioactivos ensayados. Por tanto se ensayarán los modelos donde el sustrato soporta el crecimiento de microorganismos.

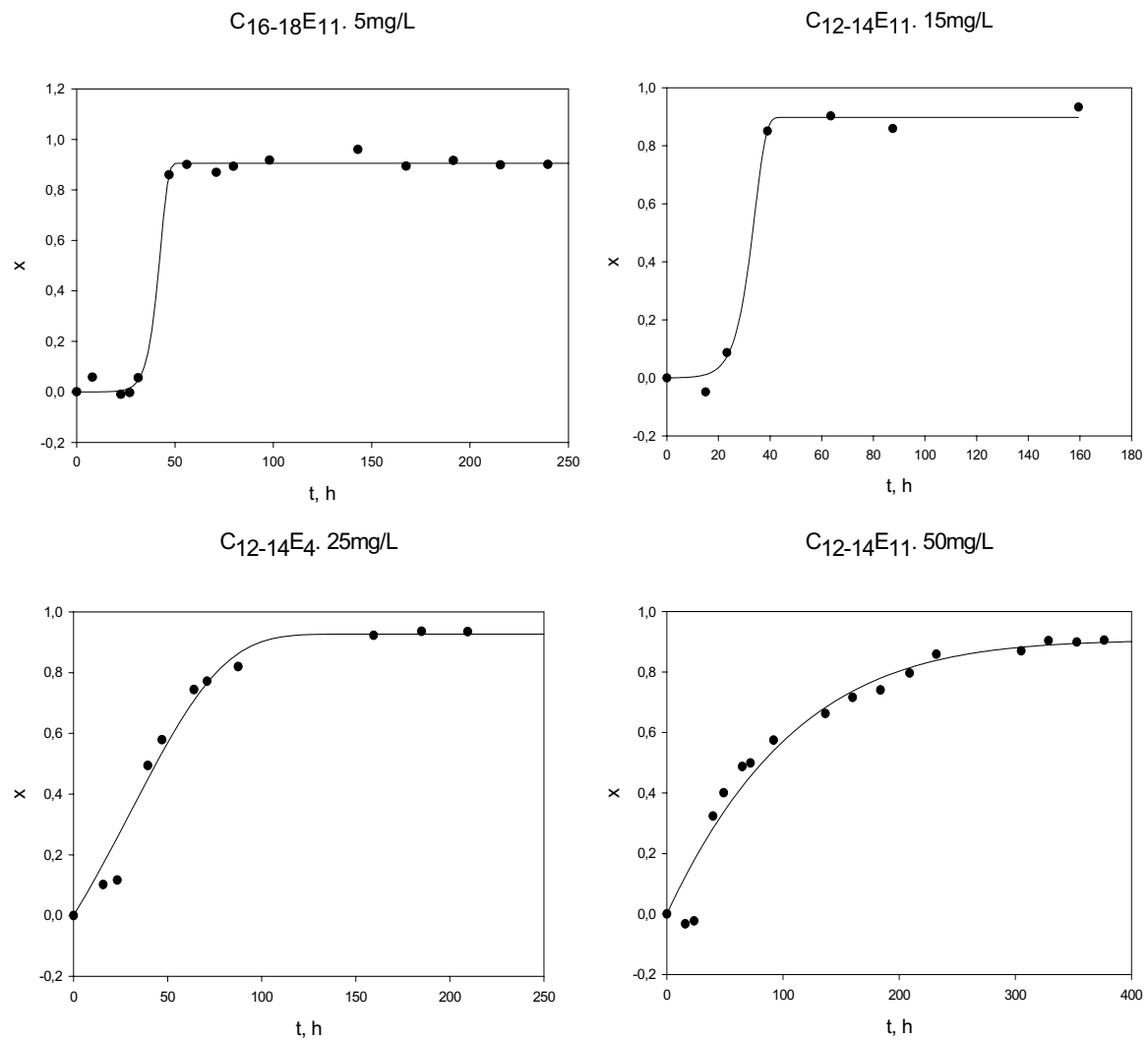


Figura V. 31.- Comparación entre los resultados experimentales y los obtenidos aplicando la ecuación 5 del modelo que considera crecimiento exponencial para la biomasa y primer orden para el sustrato

Tabla V. 20.- Parámetros cinéticos de la ecuación 5 del modelo que considera crecimiento exponencial para la biomasa y primer orden para el sustrato

FINDET 1214N/23 (C₁₂₋₁₄E₁₁)						
S₀, mg/L	β_M	β'_X	k, h⁻¹	K_M, mg/L	x_m	r
5	0.517	0.005	0.148	2.589	0.897	0.996
15	1.263	7.00·10 ⁻⁴	0.227	18.958	0.889	0.996
20	5.198	1.00·10 ⁻⁴	0.351	103.962	0.893	0.997
25	0.271	0.002	0.201	6.782	0.873	0.998
50	-0.027	0.455	-6.00·10 ⁻⁴	-1.360	0.953	0.975
FINDET 1618A/18 (C₁₆₋₁₈E₆)						
S₀, mg/L	β_M	β'_X	k, h⁻¹	K_M	x_m	r
5	1.586	1.00·10 ⁻⁴	0.427	7.930	0.908	0.995
25	0.577	0.011	0.113	14.442	0.903	0.985
50	0.448	2.76·10 ⁻⁶	0.294	22.410	0.813	0.969
FINDET 1214N/16 (C₁₂₋₁₄E₄)						
S₀, mg/L	β_M	β'_X	k, h⁻¹	K_M, mg/L	x_m	r
5	0.949	2.52·10 ⁻⁸	0.792	4.749	0.883	0.992
25	0.024	0.004	0.039	0.620	0.897	0.991
50	0.070	0.120	0.001	3.520	0.876	0.959
FINDET 1618A/23 (C₁₆₋₁₈E₁₁)						
S₀, mg/L	β_M	β'_X	k, h⁻¹	K_M, mg/L	x_m	r
5	0.105	9.44·10 ⁻⁶	0.226	0.527	0.903	0.997
FINDET 10/18 (C₁₀E₆)						
S₀, mg/L	β_M	β'_X	k, h⁻¹	K_M, mg/L	x_m	r
5	0.494	0.011	0.085	2.470	0.905	0.989
FINDET 10/15 (C₁₀E₃)						
S₀, mg/L	β_M	β'_X	k, h⁻¹	K_M, mg/L	x_m	r
5	0.691	2.00·10 ⁻⁴	0.182	3.458	0.853	0.990

En general, cuando la sustancia considerada soporta el crecimiento de los microorganismos, las velocidades de crecimiento de éstos y de desaparición del compuesto orgánico están acopladas, admitiéndose que se cumple aproximadamente la ecuación de Gaden (Gaden, 1959):

$$\frac{dX}{dt} = -Y_{ap} \frac{dS}{dt}$$

Ecuación V. 38

que por integración permite relacionar la concentración de biomasa (X) con la concentración del compuesto orgánico, sustrato (S):

$$X = X_0 + Y_{ap} (S_0 - S)$$

Ecuación V. 39

En estas condiciones, para obtener modelos de biodegradación de un sustrato, es equivalente proponer un modelo cinético para el crecimiento de los microorganismos o para el consumo de sustrato.

La aplicación de la Ecuación V. 39 hasta la primera etapa de crecimiento exponencial de los microorganismos para los diferentes tensioactivos ensayados, y teniendo en cuenta los parámetros X_0 e Y_{ap} mostrados en la Tabla V. 17, donde Y_{ap} se ha calculado siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 5.2.5., determina que puede considerarse válida la expresión propuesta por Gaden en nuestras condiciones experimentales. En la Figura V. 32 se muestra a título de ejemplo para los AGE $C_{12_14}E_{11}$, $C_{16_18}E_6$ y $C_{12_14}E_4$ a distintas concentraciones la comparación de los resultados experimentales del crecimiento de microorganismos con los calculados a partir de la Ecuación V. 39.

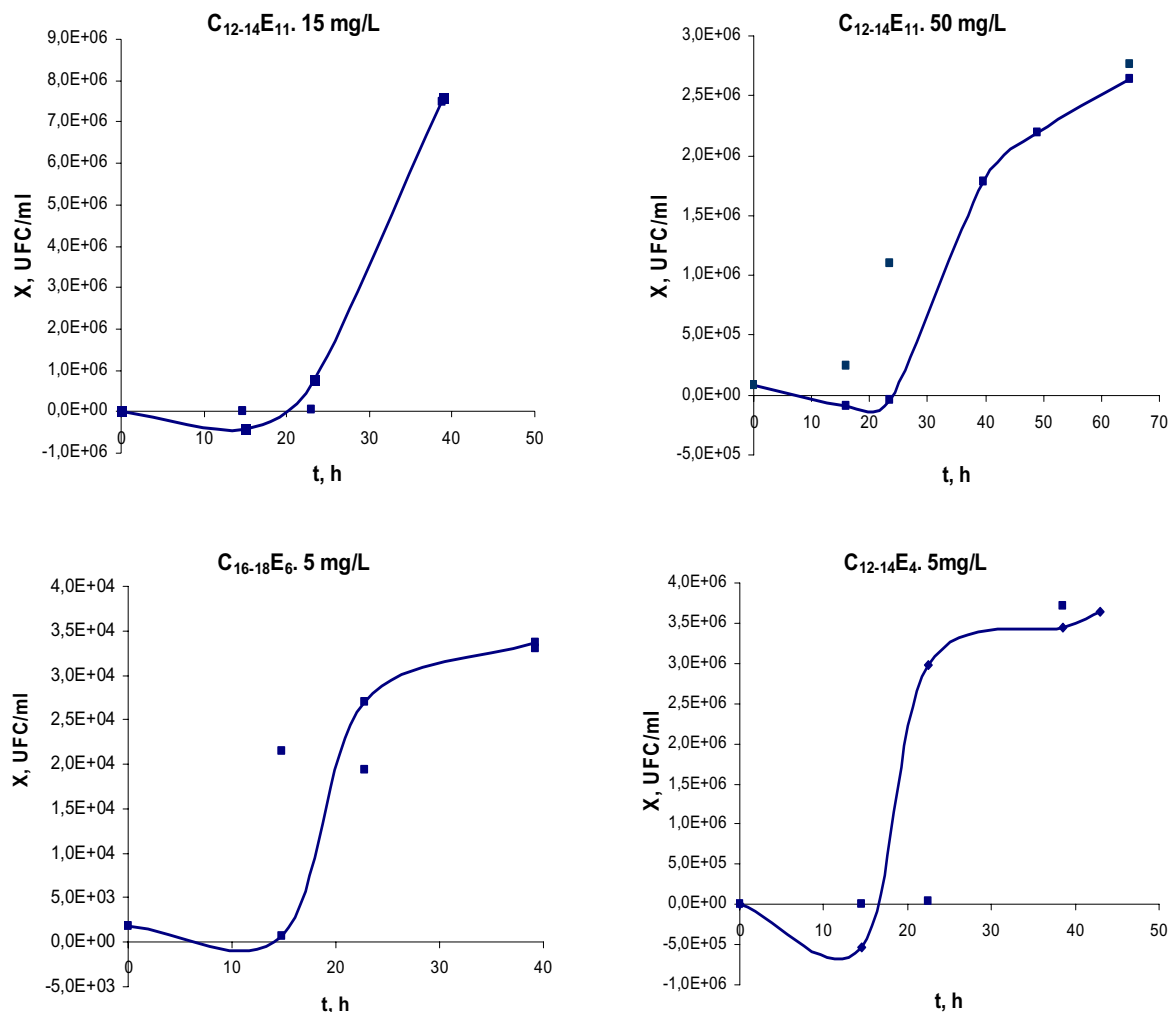


Figura V. 32.- Comparación entre los resultados experimentales y calculados del crecimiento de microorganismos para diferentes AGE

Por tanto se aplican los modelos para la biodegradación de sustratos que soportan el crecimiento de los microorganismos.

5.2.6.2. Modelos cinéticos para la biodegradación de un sustrato que soporta el crecimiento de los microorganismos

Modelo de Monod

Si se utiliza el modelo de Monod (Monod, 1949) para el crecimiento:

$$\frac{1}{X} \frac{dX}{dt} = \mu = \frac{\mu_m S}{K_S + S}$$

Ecuación V. 40

la velocidad de biodegradación del sustrato será:

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_{ap}} \frac{\mu_m S}{K_S + S} X = -\frac{\mu_m S}{K_S + S} \left(\frac{X_0}{Y_{ap}} + S_0 - S \right)$$

Ecuación V. 41

con sus dos casos limites, dependiendo de los valores relativos de K_S y S :

a) Para $K_S \gg S$:

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{\mu_m}{K_S} S \left(\frac{X_0}{Y_{ap}} + S_0 - S \right)$$

Ecuación V. 42

b) Para $K_S \ll S$:

$$\frac{dS}{dt} = -\mu_m \left(\frac{X_0}{Y_{ap}} + S_0 - S \right)$$

Ecuación V. 43

Introduciendo en la Ecuación V. 41 la conversión del sustrato (x):

$$S = S_0(1-x) \quad \frac{dx}{dt} = \frac{\mu_m(1-x)}{K_S + S_0(1-x)} \left(\frac{X_0}{Y_{ap}} + S_0 x \right)$$

Ecuación V. 44

$$\frac{dx}{dt} = \frac{\mu_m(1-x)}{\beta_S + 1-x} (\alpha_0 + x)$$

Ecuación V. 45

$$t = 0 \quad x = 0$$

donde:

$$\beta_s = \frac{K_s}{S_0} \quad \alpha_0 = \frac{X_0}{Y_{ap} S_0}$$

Ecuación V. 46

separando variables e integrando:

$$\int_0^x \frac{\beta_s + 1 - x}{(1-x)(\alpha_0 + x)} dx = \mu_m t$$

Ecuación V. 47

$$\begin{aligned} -\frac{\beta_s}{1 + \alpha_0} \ln(1-x) + \left(\frac{\beta_s}{1 + \alpha_0} + 1 \right) \ln\left(\frac{\alpha_0 + x}{\alpha_0} \right) &= \mu_m t \\ \frac{\beta_s}{1 + \alpha_0} \ln\left(\frac{\alpha_0 + x}{\alpha_0(1-x)} \right) + \ln\left(\frac{\alpha_0 + x}{x} \right) &= \mu_m t \end{aligned}$$

Ecuación V. 48

En algunos casos los sustratos considerados son sustancias complejas que pueden contener componentes no biodegradables, o por el contrario la biodegradación puede terminar antes de alcanzar la mineralización completa del sustrato, por lo que habría que considerar una fracción de sustrato no biodegradable, S_R .

Las simplificaciones límites de la ecuación de Monod, Ecuación V. 42 y Ecuación V. 43, con una fracción del sustrato no biodegradable, conducen a:

a) Para $K_S \gg S$:

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{\mu_m}{K_S} (S - S_R) \left(\frac{X_0}{Y_{ap}} + S_0 - S \right) = -\frac{\mu_m}{K_S} S^2 + \frac{\mu_m}{K_S} \left(\frac{X_0}{Y_{ap}} + S_0 + S_R \right) S - \frac{\mu_m}{K_S} S_R \left(\frac{X_0}{Y_{ap}} + S_0 \right)$$

Ecuación V. 49

expresión semejante a la propuesta por Quiroga y col. (Quiroga, 1998):

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

Ecuación V. 50

de manera que los parámetros primarios, de la ecuación cinética inicial, son:

$$K_2 = -\frac{\mu_m}{K_S} \quad K_1 = \frac{\mu_m}{K_S} \left(\frac{X_0}{Y_{ap}} + S_0 + S_R \right) \quad K_0 = -\frac{\mu_m}{K_S} S_R \left(\frac{X_0}{Y_{ap}} + S_0 \right)$$

Ecuación V. 51

y los parámetros finales, de la expresión integrada:

$$p = \sqrt{K_1^2 - 4K_2K_0} = \frac{\mu_m}{K_S} \sqrt{\left(\frac{X_0}{Y_{ap}} + S_0 + S_R \right)^2 - 4S_R \left(\frac{X_0}{Y_{ap}} + S_0 \right)} =$$

$$\frac{\mu_m}{K_S} \sqrt{\left(\frac{X_0}{Y_{ap}} + S_0 - S_R \right)^2} = \frac{\mu_m}{K_S} \left(\frac{X_0}{Y_{ap}} + S_0 - S_R \right)$$

Ecuación V. 52

$$q = \frac{-\frac{\mu_m}{K_S} \left(\frac{X_0}{Y_{ap}} + S_0 + S_R \right) + \frac{\mu_m}{K_S} \left(\frac{X_0}{Y_{ap}} + S_0 - S_R \right)}{2 \left(-\frac{\mu_m}{K_S} \right)} = S_R$$

Ecuación V. 53

$$h = \frac{-\frac{\mu_m}{K_S} \left(\frac{X_0}{Y_{ap}} + S_0 + S_R \right) - \frac{\mu_m}{K_S} \left(\frac{X_0}{Y_{ap}} + S_0 - S_R \right)}{2 \left(-\frac{\mu_m}{K_S} \right)} = \frac{X_0}{Y_{ap}} + S_0$$

Ecuación V. 54

tal como estos mismos autores indican.

Si tenemos en cuenta la definición de conversión:

$$x_m = \frac{S_0 - S_R}{S_0} \quad S_R = S_0(1 - x_m)$$

Ecuación V. 55

la expresión integrada en función de la conversión sería:

$$\frac{dx}{dt} = \frac{\mu_m}{\beta_S} (x_m - x)(\alpha_0 + x)$$

$$t = 0 \quad x = 0$$

Ecuación V. 56

separando variables e integrando:

$$\int_0^x \frac{dx}{(x_m - x)(\alpha_0 + x)} = -\frac{1}{x_m + \alpha_0} \ln \left(\frac{x_m - x}{x_m} \right) + \frac{1}{x_m + \alpha_0} \ln \left(\frac{\alpha_0 + x}{\alpha_0} \right)$$

$$\ln \left(\frac{x_m(\alpha_0 + x)}{\alpha_0(x_m - x)} \right) = \frac{\mu_m}{\beta_S} (x_m + \alpha_0) t$$

Ecuación V. 57

y puede expresarse en forma explícita para x :

$$x = \frac{\alpha_0 x_m \left(1 - \exp\left(-\frac{\mu_m}{\beta_S} (x_m + \alpha_0) t\right) \right)}{x_m \exp\left(-\frac{\mu_m}{\beta_S} (x_m + \alpha_0) t\right) + \alpha_0}$$

Ecuación V. 58

b) Para $K_S \ll S$:

$$\frac{dx}{dt} = \mu_m (\alpha_0 + x)$$

Ecuación V. 59

$$t = 0 \quad x = 0$$

$$\ln\left(\frac{\alpha_0 + x}{\alpha_0}\right) = \mu_m t$$

$$x = \alpha_0 (\exp(\mu_m t) - 1)$$

Ecuación V. 60

ya que evidentemente el orden cero no puede mantenerse hasta conversiones muy altas.

En la Tabla V. 21 se resumen las ecuaciones propuestas para la aplicación del modelo de Monod en las diferentes condiciones expuestas anteriormente en función de la conversión.

Tabla V. 21.- Modelo cinético de Monod en función de la conversión

CONDICIONES	ECUACIÓN CINÉTICA
Modelo general de Monod sin considerar una fracción de sustrato no biodegradable	$\frac{\beta_s}{1 + \alpha_0} \ln\left(\frac{\alpha_0 + x}{\alpha_0(1-x)}\right) + \ln\left(\frac{\alpha_0 + x}{x}\right) = \mu_m t$
Modelo de Monod para $K_S \gg S$ y una concentración residual de sustrato no biodegradable (S_R),	$x = \frac{\alpha_0 x_m \left(1 - \exp\left(-\frac{\mu_m}{\beta_s} (x_m + \alpha_0) t\right)\right)}{x_m \exp\left(-\frac{\mu_m}{\beta_s} (x_m + \alpha_0) t\right) + \alpha_0}$
Modelo de Monod para $K_S \ll S$ y una concentración residual de sustrato no biodegradable (S_R),	$x = \alpha_0 (\exp(\mu_m t) - 1)$

En la Figura V. 33 se muestran los resultados obtenidos de la aplicación de las diferentes ecuaciones del modelo de Monod (Tabla V. 21) a los tensioactivos C₁₂₋₁₄E₁₁ y C₁₆₋₁₈E₁₁ que se han elegido como ejemplo. Se observa que sólo es aplicable el modelo de Monod que considera $K_S \gg S$ (Ecuación V. 58) y una concentración residual de sustrato no biodegradable. Resultados análogos se obtienen para los diferentes tensioactivos a las distintas concentraciones ensayadas.

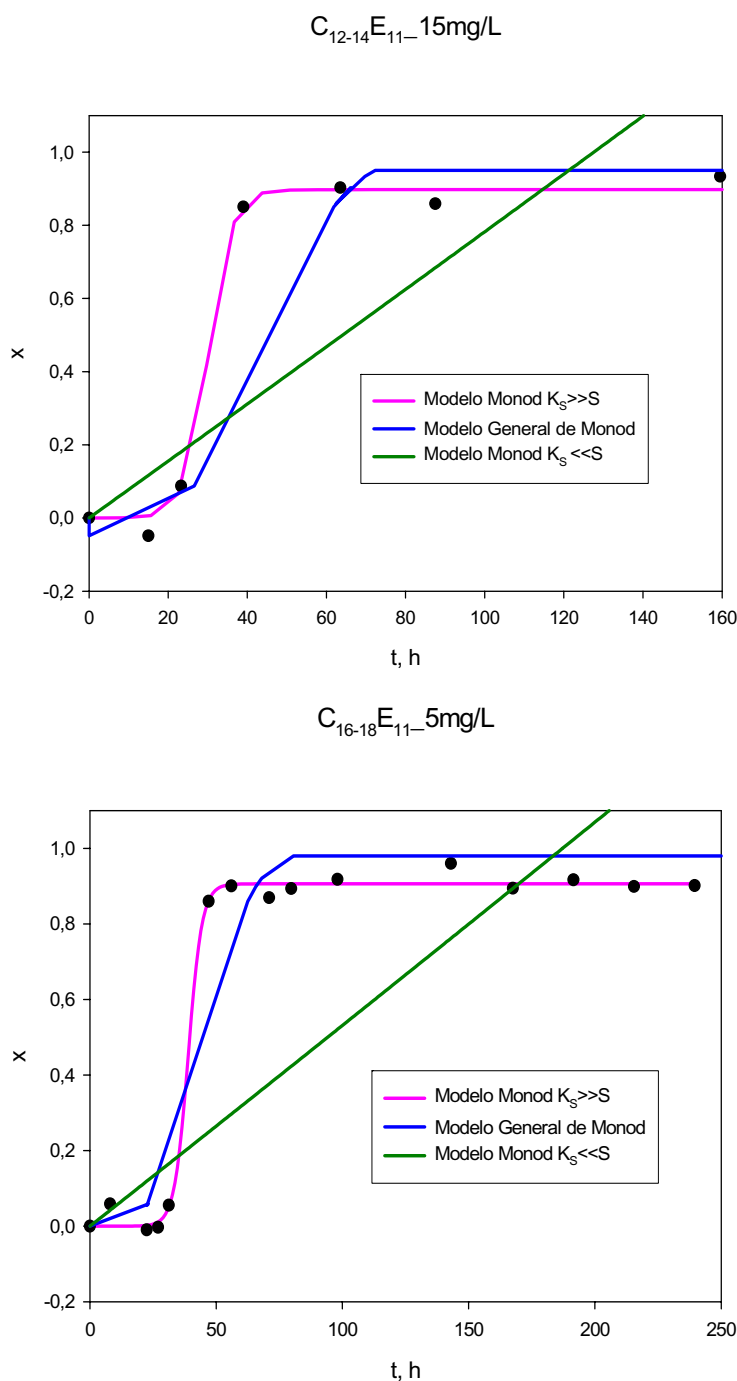


Figura V. 33.- Aplicación de las diferentes ecuaciones del modelo de Monod para los tensioactivos $C_{12-14}E_{11}$ y $C_{16-18}E_{11}$

En la Tabla V. 22 se recopilan los parámetros cinéticos α_0 , β_S , μ_m y x_m obtenidos de la aplicación de la Ecuación V. 58 a todos los tensioactivos ensayados, así como el coeficiente de correlación r y la constante de saturación K_S , obtenida aplicando la relación establecida con la concentración inicial de sustrato (Ecuación V. 46). Estos parámetros se han obtenidos por regresión no lineal utilizando el soporte informático SigmaPlot[®].

Tabla V. 22.- Parámetros cinéticos del modelo propuesto para los AGE

(Ecuación V. 58)

FINDET 1214N/23 (C ₁₂₋₁₄ E ₁₁)						
S ₀ , mg/L	α_0	β_s	μ_m, h^{-1}	K _S , mg/L	x _m	r
5	2.30·10 ⁻³	0.064	0.015	0.321	0.907	0.998
15	4.51·10 ⁻⁵	0.129	0.046	1.924	0.899	0.997
20	3.60·10 ⁻⁶	0.042	0.020	0.852	0.897	0.999
25	2.30·10 ⁻³	0.050	0.016	1.265	0.879	0.998
50	1.200	0.359	0.002	17.995	0.895	0.977
Parámetros recalculados						
S ₀ , mg/L	α_0	β_s	μ_m, h^{-1}	K _S , mg/L	x _m	r
5	2.30·10 ⁻³	0.102	0.024	1.101	0.907	0.998
15	4.51·10 ⁻⁵	0.067	0.024	1.101	0.899	0.997
20	3.58·10 ⁻⁶	0.050	0.024	1.101	0.897	0.999
25	2.30·10 ⁻³	0.074	0.024	1.101	0.879	0.998
FINDET 1618A/18 (C ₁₆₋₁₈ E ₆)						
S ₀ , mg/L	α_0	β_s	μ_m, h^{-1}	K _S , mg/L	x _m	r
5	8.86·10 ⁻⁶	0.040	0.023	0.201	0.908	0.995
25	4.60·10 ⁻³	0.075	0.014	1.877	0.907	0.989
50	6.58·10 ⁻²	0.138	0.007	6.910	0.899	0.984
FINDET 1214N/16 (C ₁₂₋₁₄ E ₄)						
S ₀ , mg/L	α_0	β_s	μ_m, h^{-1}	K _S , mg/L	x _m	r
5	9.46·10 ⁻⁹	0.031	0.030	0.156	0.888	0.991
25	6.04·10 ⁻²	0.116	0.008	2.920	0.905	0.955
50	2.381	0.869	8.00·10 ⁻⁴	43.475	0.992	0.959
FINDET 1618A/23 (C ₁₆₋₁₈ E ₁₁)						
S ₀ , mg/L	α_0	β_s	μ_m, h^{-1}	K _S , mg/L	x _m	r
5	3.87·10 ⁻⁶	0.051	0.017	0.257	0.907	0.998
FINDET 10/18 (C ₁₀ E ₆)						
S ₀ , mg/L	α_0	β_s	μ_m, h^{-1}	K _S , mg/L	x _m	r
5	8.30·10 ⁻³	0.083	0.010	0.415	0.916	0.990
FINDET 10/15 (C ₁₀ E ₃)						
S ₀ , mg/L	α_0	β_s	μ_m, h^{-1}	K _S , mg/L	x _m	r
5	8.67·10 ⁻⁶	0.055	0.018	0.275	0.856	0.992

Se observa para el tensioactivo C₁₂₋₁₄E₁₁, donde se ha modificado en mayor medida la concentración de sustrato, que excepto para la concentración de 50 mg/L tanto la velocidad máxima de crecimiento μ_m como la constante K_S permanecen prácticamente constantes con la concentración de sustrato, por lo que se ha tomado un valor medio para

estas constantes y se han recalculado el resto de los parámetros del modelo α_0 , β_S y x_m que también se muestran en la Tabla V. 22.

En la Figura V. 34 se representa el parámetro β_S frente a la concentración de sustrato obteniéndose la relación lineal prevista hasta la concentración de 20 mg/L, la concentración de 25 mg/L no sigue el mismo comportamiento. Estos resultados parecen indicar que a concentraciones elevadas y superiores a la CMC, lo que ocurre para este tensioactivo (Tabla III. 1), el comportamiento cinético del tensioactivo es diferente que para bajas concentraciones. Este hecho ya fue establecido para otros AGE cuando la concentración inicial de ensayo es muy superior a la CMC por Zhang y col. (Zhang, 1999).

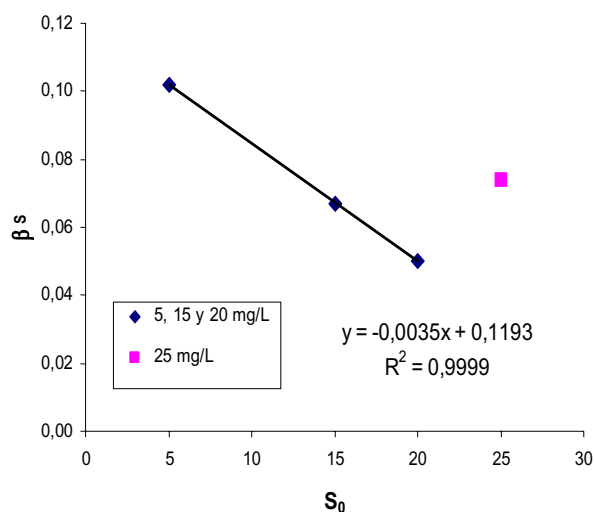


Figura V. 34.- Representación de β_S frente a la concentración inicial de tensioactivo para $C_{12-14}E_{11}$

Por tanto el modelo reproduce los resultados experimentales hasta concentraciones de 20 mg/L con los mismos parámetros cinéticos, para la concentración de 25 mg/L también puede ser utilizado el modelo, pero los parámetros cinéticos son diferentes. En la Figura V. 35 se comparan los valores experimentales y calculados de la conversión con el modelo propuesto. Se observa que para la concentración de 50 mg/L las desviaciones son importantes y el modelo no define el perfil de biodegradación experimental encontrado, a esta concentración el ajuste es peor y la constante K_S presenta un valor muy elevado.

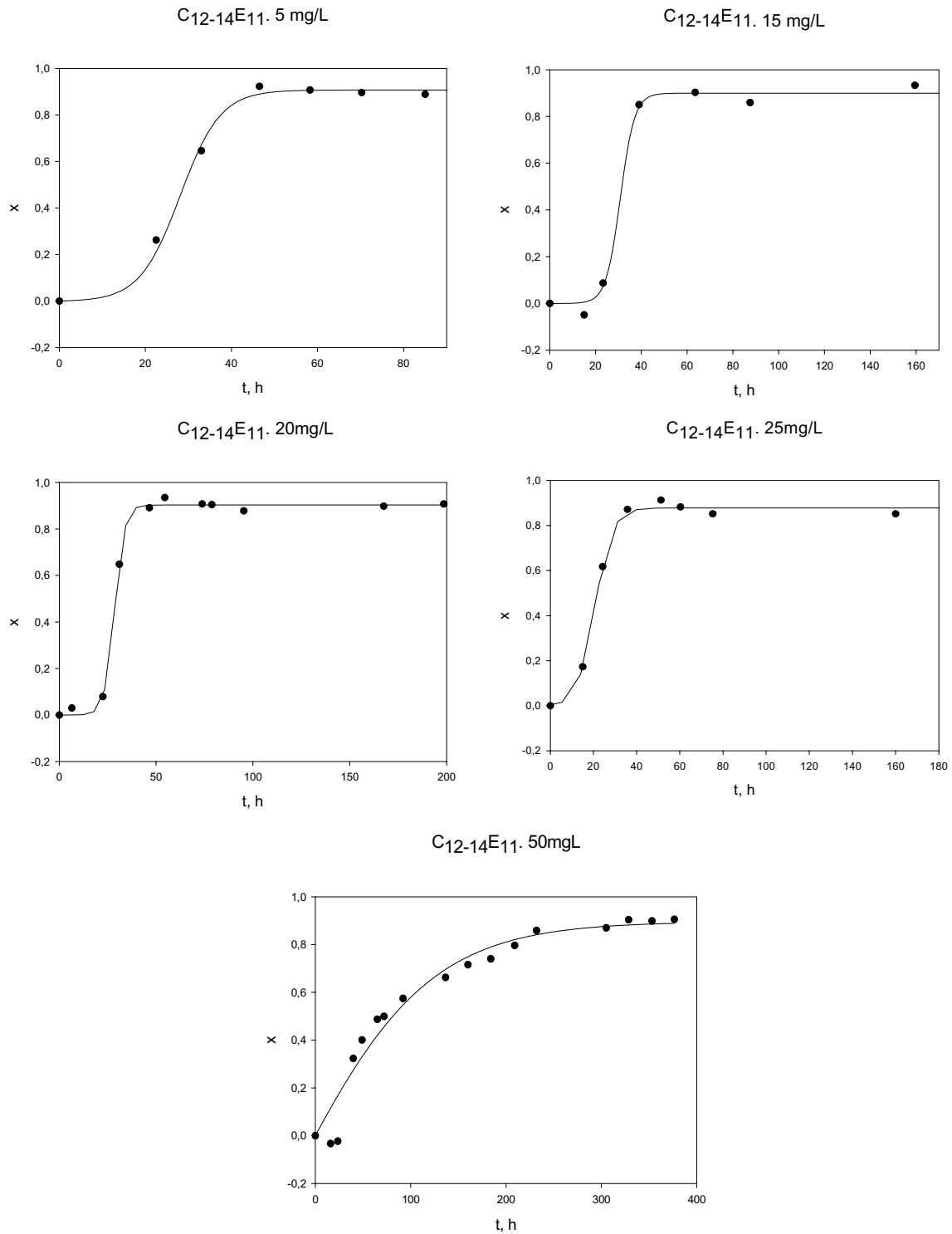


Figura V. 35.- Comparación entre los resultados experimentales y los obtenidos aplicando el modelo propuesto para el tensioactivo $C_{12-14}E_{11}$ a diferentes concentraciones iniciales

Para los tensioactivos $C_{16-18}E_6$ y $C_{12-14}E_4$, los parámetros cinéticos son diferentes para las concentraciones extremas ensayadas (25 y 50 mg/L). Para el resto de tensioactivos

ensayados: $C_{16-18}E_{11}$, $C_{10}E_6$ y $C_{10}E_3$, al no haberse modificado la concentración inicial de tensioactivo en el ensayo los parámetros del modelo son los presentados en la Tabla V. 22.

En la Figura V. 36 y Figura V. 37 y Figura V. 38 se comparan los resultados obtenidos de la aplicación del modelo y los resultados experimentales para estos tensioactivos. Se observa una buena concordancia entre ellos excepto para las concentraciones más elevadas de tensioactivo (50 mg/L) para la cual el modelo no reproduce satisfactoriamente los resultados experimentales.

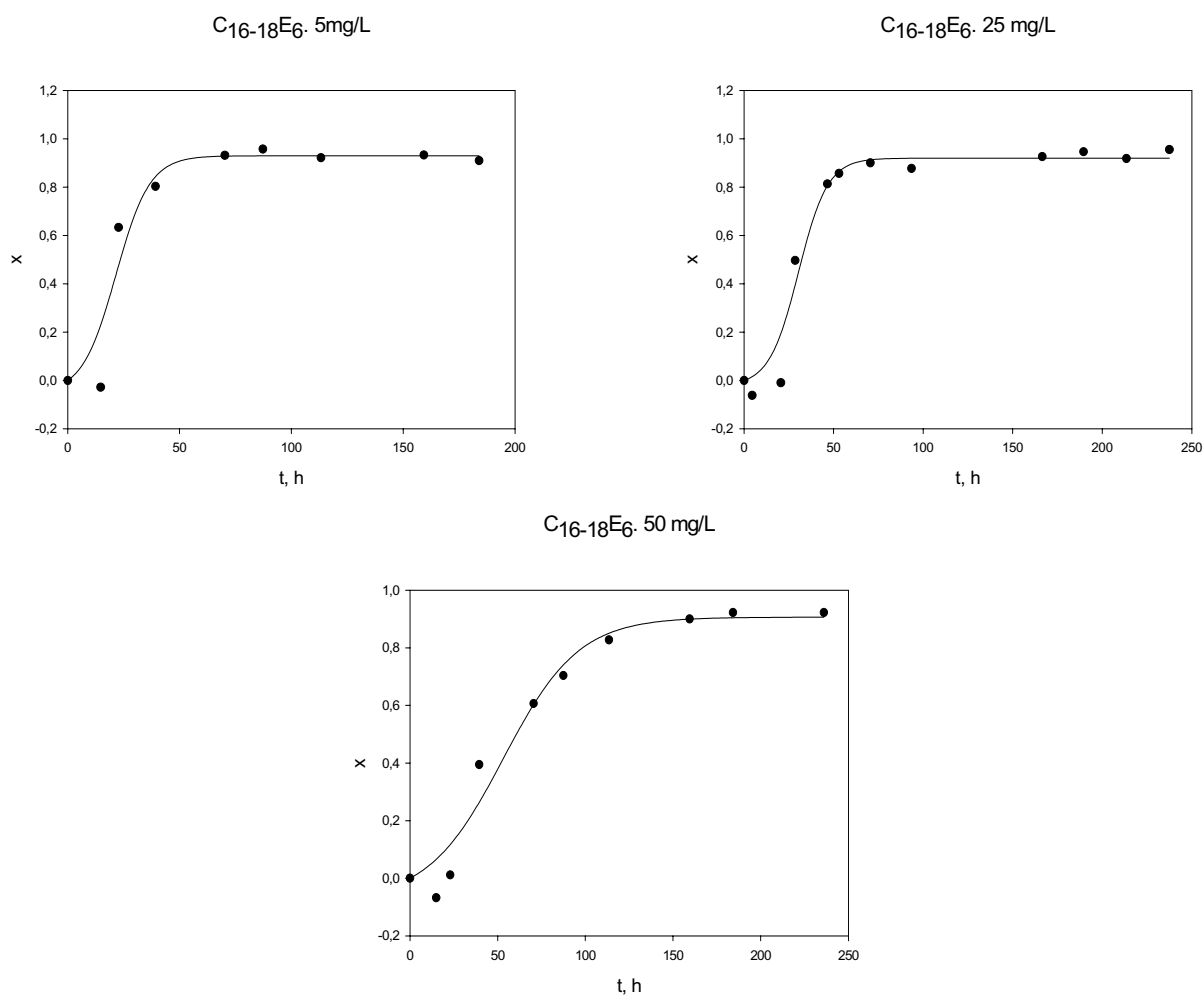


Figura V. 36.- Comparación entre los resultados experimentales y los obtenidos aplicando el modelo propuesto para el tensioactivo $C_{16-18}E_6$ a diferentes concentraciones iniciales

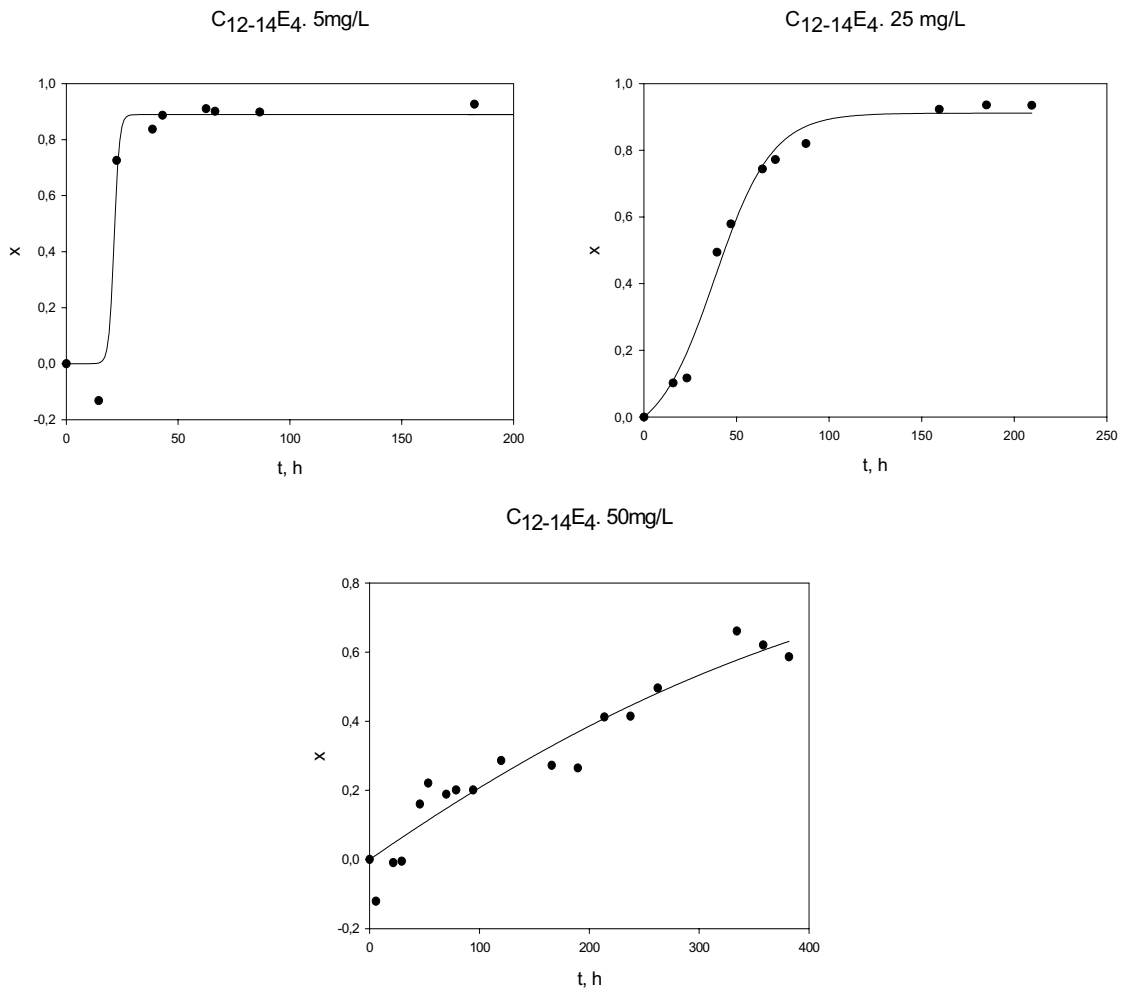


Figura V. 37.- Comparación entre los resultados experimentales y los obtenidos aplicando el modelo propuesto para el tensioactivo $C_{12-14}E_4$ a diferentes concentraciones iniciales

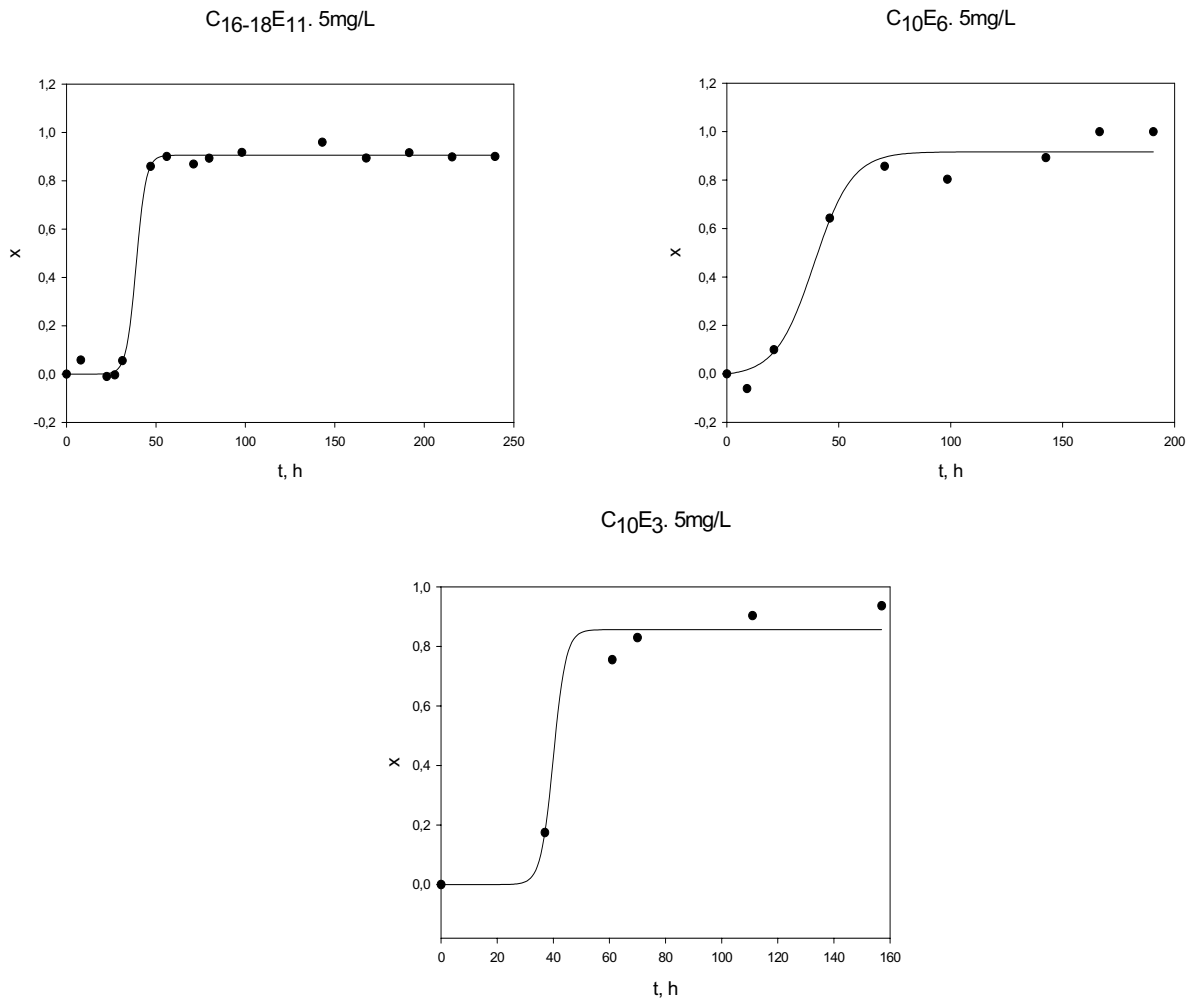


Figura V. 38.- Comparación entre los resultados experimentales y los obtenidos aplicando el modelo propuesto para los tensioactivos $C_{16-18}E_{11}$, $C_{10}E_6$ y $C_{10}E_3$

En la Figura V. 39 se comparan los valores de conversión experimentales y los calculados con el modelo de Monod (Ecuación V. 58) con los parámetros indicados en la Tabla V. 22. La desviación relativa media calculada según la siguiente expresión:

$$DES = \frac{\sum |x_{\text{experimental}} - x_{\text{teórico}}|}{\sum x_{\text{experimental}}}$$

Ecuación V. 61

ha sido de: 4.54 %, para bajas concentraciones (5, 15 y 20 mg/L): 5.43 % para 25 mg/L: y 11.50 % para 50 mg/L.

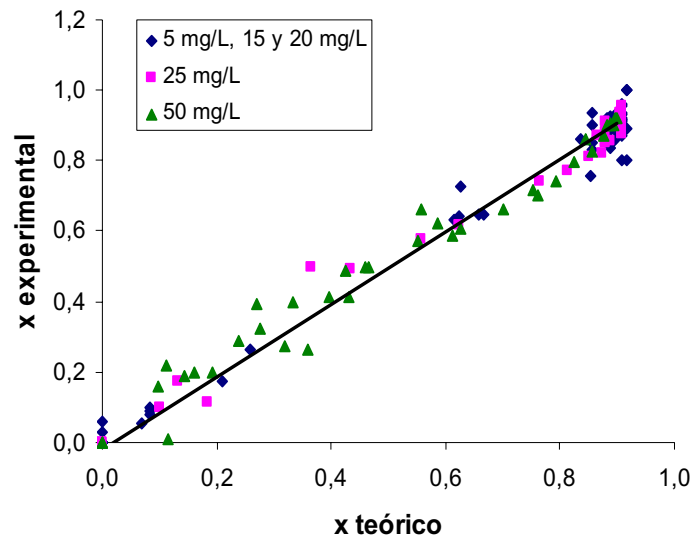


Figura V. 39.- Comparación entre los valores de conversión experimentales y calculados según el modelo de Monod para los AGE a diferentes concentraciones

Aplicación y comprobación del modelo cinético propuesto para la evaluación de los parámetros cinéticos

Teniendo en cuenta los parámetros cinéticos evaluados para los perfiles de biodegradación (Tabla V. 22) se ha aplicado el modelo cinético para evaluar el t_L y el $t_{1/2}$ despejando el tiempo de la Ecuación V. 57:

$$t = \frac{\ln\left(\frac{x_m(\alpha_0 + x)}{\alpha_0(x_m - x)}\right)}{\frac{\mu_m(x_m + \alpha_0)}{\beta_S}}$$

Ecuación V. 62

Para calcular el tiempo de latencia se sustituyen todos los parámetros cinéticos y el término $x = 0.1$ en la Ecuación V. 62, para determinar el tiempo de vida media se procede igual pero sustituyendo $x = 0.5$. Los resultados obtenidos se muestran y se comparan con los valores experimentales obtenidos de los perfiles de biodegradación en la Tabla V. 24.

También es posible calcular la velocidad específica de crecimiento (μ) (Tabla V. 23) a partir de los perfiles de biodegradación primaria (Figura V. 13, Figura V. 15 y Figura V. 16) de la siguiente forma:

Teniendo en cuenta la expresión para el crecimiento exponencial:

$$X = X_0 \cdot \exp(\mu \cdot t)$$

Ecuación V. 63

para $t = t_1$ y para $t = t_2$ la ecuación anterior adopta las expresiones:

$$t=t_1 \quad X_1 = X_0 \cdot \exp(\mu \cdot t_1)$$

Ecuación V. 64

$$t=t_2 \quad X_2 = X_0 \cdot \exp(\mu \cdot t_2)$$

Ecuación V. 65

donde t_1 y t_2 son dos tiempos cualesquiera correspondientes a la fase de degradación del sustrato y X_1 y X_2 la concentración de biomasa correspondiente.

Suponiendo μ constante cuando $S \gg K_S$ (esto se cumple para tiempos bajos, es decir, al inicio de la biodegradación) y asumiendo un rendimiento Y ($g_{\text{microorganismos}}/g_{\text{sustrato}}$) constante, se puede relacionar la concentración de microorganismos en cada instante con la cantidad de sustrato consumida a través de las expresiones:

$$\frac{X_1}{Y} = \frac{X_0}{Y} e^{\mu \cdot t_1}$$

Ecuación V. 66

$$\frac{X_2}{Y} = \frac{X_0}{Y} e^{\mu \cdot t_2}$$

Ecuación V. 67

donde X_1/Y se define como los gramos de sustrato que producen X_1 gramos de microorganismos y X_2/Y los gramos de sustrato que producen X_2 gramos de microorganismos.

X_1/Y puede ser:

$$\frac{[S]_i - [S]_{t1}}{[S]_i}$$

Ecuación V. 68

X_2/Y puede ser:

$$\frac{[S]_i - [S]_{t2}}{[S]_i}$$

Ecuación V. 69

si se dispone de datos de concentración de tensioactivo residual o de oxígeno disuelto frente a tiempo. También puede ser el cociente entre demanda de oxígeno y demanda de oxígeno total si se dispone de datos de demanda de oxígeno frente a tiempo:

$$\frac{X}{Y} = \frac{DO}{DO_T}$$

Ecuación V. 70

Si se dividen la Ecuación V. 66 y la Ecuación V. 67 se obtiene la ecuación que permite el cálculo de μ a partir de los datos de un perfil de biodegradación (primaria o última):

$$\ln \left[\frac{X_1/Y}{X_2/Y} \right] = \mu(t_1 - t_2)$$

Ecuación V. 71

En la Tabla V. 23 se comparan los parámetros experimentales obtenidos de los perfiles de biodegradación y los obtenidos tras la aplicación del modelo. Se observa que a pesar del error experimental en la estimación de parámetros a partir de los perfiles de biodegradación (fundamentalmente para μ), existe una buena concordancia entre ellos.

Tabla V. 23.- Comparación de los parámetros experimentales y los obtenidos de la aplicación del modelo propuesto para diferentes AGE

FINDET 1214N/23 (C ₁₂₋₁₄ E ₁₁)						
	Parámetros experimentales			Parámetros modelo		
S ₀ , mg/L	t _L , h	t _{1/2} , h	μ, h ⁻¹	t _L , h	t _{1/2} , h	μ _m , h ⁻¹
5	22.51	26.20	0.052	16.32	28.58	0.027
15	22.28	30.75	0.144	23.80	30.62	0.027
20	22.52	27.68	0.077	23.04	28.98	0.027
25	15.00	19.71	0.078	13.86	22.05	0.016
FINDET 1618A/18 (C ₁₆₋₁₈ E ₆)						
	Parámetros experimentales			Parámetros modelo		
S ₀ , mg/L	t _L , h	t _{1/2} , h	μ, h ⁻¹	t _L , h	t _{1/2} , h	μ _m , h ⁻¹
5	14.74	21.13	0.273	17.53	21.78	0.023
25	20.37	28.54	0.258	18.91	32.09	0.014
FINDET 1214N/16 (C ₁₂₋₁₄ E ₄)						
	Parámetros experimentales			Parámetros modelo		
S ₀ , mg/L	t _L , h	t _{1/2} , h	μ, h ⁻¹	t _L , h	t _{1/2} , h	μ _m , h ⁻¹
5	14.50	19.29	0.280	19.00	21.71	0.030
25	23.79	40.91	0.089	25.73	43.60	0.008
FINDET 1618A/23 (C ₁₆₋₁₈ E ₁₁)						
	Parámetros experimentales			Parámetros modelo		
S ₀ , mg/L	t _L , h	t _{1/2} , h	μ, h ⁻¹	t _L , h	t _{1/2} , h	μ _m , h ⁻¹
5	29.71	39.42	0.069	32.53	39.79	0.017
FINDET 10/18 (C ₁₀ E ₆)						
	Parámetros experimentales			Parámetros modelo		
S ₀ , mg/L	t _L , h	t _{1/2} , h	μ, h ⁻¹	t _L , h	t _{1/2} , h	μ _m , h ⁻¹
5	9.00	19.14	0.043	22.54	41.19	0.010
FINDET 10/15 (C ₁₀ E ₃)						
	Parámetros experimentales			Parámetros modelo		
S ₀ , mg/L	t _L , h	t _{1/2} , h	μ, h ⁻¹	t _L , h	t _{1/2} , h	μ _m , h ⁻¹
5	37.00	50.43	0.060	33.81	42.24	0.018

Modelos para la biodegradación de sustratos que inhiben el crecimiento de microorganismos

La concentración de 50 mg/L para todos los tensioactivos ensayados no se ajusta mediante el modelo cinético que supone crecimiento de microorganismos según la ecuación de Monod y una cinética de Michaelis Menten para la biodegradación de sustrato, a estas concentraciones parece existir una inhibición por sustrato de los microorganismos, por lo que se aplica para estas concentraciones el Modelo de Andrews para el crecimiento de microorganismos.

Modelo de Andrews

Si se considera el modelo de Andrews para el crecimiento, aplicable a la biodegradación de sustratos que inhiben el crecimiento, la velocidad específica de crecimiento y la velocidad de disminución del sustrato vienen dadas por las siguientes ecuaciones:

$$\mu = \frac{\mu_m S}{K_s + S + \frac{S^2}{K_i}}$$

Ecuación V. 72

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{\mu_m S}{K_s + S + \frac{S^2}{K_i}} \left(\frac{X_0}{Y_{ap}} + S_0 + S \right)$$

Ecuación V. 73

introduciendo en la Ecuación V. 73 la conversión del sustrato:

$$\frac{dx}{dt} = \frac{\mu_m (1-x)}{\beta_s + 1-x + \beta_i (1-x)^2} (\alpha_0 + x) \quad \beta_i = \frac{S_0}{K_i}$$

Ecuación V. 74

que por integración conduce a:

$$\frac{\beta_s}{1 + \alpha_0} \ln \left(\frac{\alpha_0 + x}{\alpha_0(1-x)} \right) + (1 + \beta_i(1 + \alpha_0)) \ln \left(\frac{\alpha_0 + x}{\alpha_0} \right) - \beta_i x = \mu_m t$$

Ecuación V. 75

ecuación que para $\beta_i = 0$, se reduce a la anteriormente obtenida aplicando el modelo de Monod, Ecuación V. 48.

En el caso de considerar una concentración de sustrato no biodegradable la Ecuación V. 73 quedaría en la forma:

$$\frac{dS}{dt} = - \frac{\mu_m (S - S_R) \left(\frac{X_0}{Y_{ap}} + S_0 - S \right)}{K_S + S - S_R + \frac{(S - S_R)^2}{K_i}}$$

Ecuación V. 76

Introduciendo la conversión máxima definida por la Ecuación V. 55, la Ecuación V. 76 se reduce a:

$$\frac{dx}{dt} = \frac{\mu_m (x_m - x)(\alpha_0 + x)}{\beta_s + x_m - x + \beta_i (x_m - x)^2}$$

Ecuación V. 77

la integración conduce a:

$$\frac{\beta_s}{x_m + \alpha_0} \ln \left(\frac{x_m(\alpha_0 + x)}{\alpha_0(x_m - x)} \right) + (1 + \beta_i(x_m + \alpha_0)) \ln \left(\frac{\alpha_0 + x}{\alpha_0} \right) - \beta_i x = \mu_m t$$

Ecuación V. 78

donde β_s y β_i han sido definidas en las Ecuación V. 46 y Ecuación V. 74 respectivamente.

Obsérvese que en ausencia de inhibición la Ecuación V. 78 se reduce a:

$$\frac{\beta_s}{x_m + \alpha_0} \ln \left(\frac{x_m (\alpha_0 + x)}{\alpha_0 (x_m - x)} \right) + \ln \left(\frac{\alpha_0 + x}{\alpha_0} \right) = \mu_m t$$

Ecuación V. 79

que es la expresión general utilizando la ecuación de Monod, que se reduce a Ecuación V. 58 cuando predomina el primer término del primer miembro ($\beta_s \gg 1$), y a la Ecuación V. 59 cuando predomina el segundo ($\beta_s \ll 1$).

En la Tabla V. 24 se muestran las diferentes ecuaciones para la aplicación del modelo de Andrews.

Tabla V. 24.- Modelo cinético de Andrews en función de la conversión

CONDICIONES	ECUACIÓN CINÉTICA
Modelo General	$\frac{\beta_s}{1 + \alpha_0} \ln \left(\frac{\alpha_0 + x}{\alpha_0 (1 - x)} \right) + (1 + \beta_i (1 + \alpha_0)) \ln \left(\frac{\alpha_0 + x}{\alpha_0} \right) - \beta_i x = \mu_m t$
Concentración de sustrato no biodegradable (S _R)	$\frac{\beta_s}{x_m + \alpha_0} \ln \left(\frac{x_m (\alpha_0 + x)}{\alpha_0 (x_m - x)} \right) + (1 + \beta_i (x_m + \alpha_0)) \ln \left(\frac{\alpha_0 + x}{\alpha_0} \right) - \beta_i x = \mu_m t$

Si la inhibición predomina, la Ecuación V. 78 puede simplificarse a:

$$\beta_i (x_m + \alpha_0) \ln \left(\frac{\alpha_0 + x}{\alpha_0} \right) - \beta_i x = \mu_m t$$

Ecuación V. 80

que puede linealizarse en la forma:

$$\frac{x}{t} = (x_m + \alpha_0) \frac{1}{t} \ln \left(\frac{\alpha_0 + x}{\alpha_0} \right) - \frac{\mu_m}{\beta_i}$$

Ecuación V. 81

La aplicación del modelo de Andrews a nuestros resultados experimentales para la concentración de 50 mg/L solo ha sido posible, considerando el modelo general y una concentración de sustrato no biodegradable (Tabla V. 24), a los tensioactivos C₁₂₋₁₄E₁₁ C₁₆₋₁₈E₆ y C₁₂₋₁₄E₄. Los parámetros de aplicación del modelo se muestran en la Tabla V. 25 junto con la constante de inhibición K_i calculada a partir de la siguiente expresión:

$$\beta_i = \frac{S_0}{K_i}$$

Se observa que la constante de inhibición es mucho mayor para los tensioactivos de mayor peso molecular, mayor grado de etoxilación y mayor cadena carbonada.

Tabla V. 25.- Parámetros cinéticos del modelo de Andrews para diferentes AGE a 50 mg/L

FINDET 1214N/23 (C ₁₂₋₁₄ E ₁₁)							
S ₀ , mg/L	α ₀	β _s	μ _m , h ⁻¹	β _i	K _i , mg/L	x _m	r
50	37.591	22.436	0.006	0.033	1515.15	0.934	0.9906
FINDET 1618A/18 (C ₁₆₋₁₈ E ₆)							
S ₀ , mg/L	α ₀	β _s	μ _m , h ⁻¹	β _i	K _i , mg/L	x _m	r
50	5.049	0.575	0.033	0.020	2500	0.927	0.9813
FINDET 1214N/16 (C ₁₂₋₁₄ E ₄)							
S ₀ , mg/L	α ₀	β _s	μ _m , h ⁻¹	β _i	K _i , mg/L	x _m	r
50	26.961	22.337	0.0013	0.701	71.32	1.540	0.9621

5.3. BIODEGRADACIÓN DE NONILFENOL POLIETOXILADO

Los primeros tensioactivos utilizados en las formulaciones detergentes eran tensioactivos catiónicos, pero su persistencia en el medio obligó a limitar su uso por su escasa biodegradación y a exigir que todos los tensioactivos que formaban parte de las formulaciones detergentes fueran biodegradables. Como productos alternativos empezaron a utilizarse mezclas de tensioactivos aniónicos y tensioactivos no iónicos del tipo etoxilados, convirtiéndose en producto estrella el nonilfenol polietoxilado.

Los alquifenol etoxilados, y en particular los nonilfenol polietoxilados, son tensioactivos no iónicos que se vierten en grandes cantidades a las plantas de tratamiento de aguas residuales o directamente a entornos ambientales. Los NPEO pueden ser degradados biológicamente en plantas de tratamiento y en medios naturales. En aguas naturales se ha comprobado que los NPEO no son persistentes, pero algunos productos de degradación pueden presentar una persistencia moderada, en especial bajo condiciones anaerobias (Maguire, 1999).

La ramificación del grupo nonil en los NP y NPEO retardan la biodegradación así como un incremento en la longitud de la cadena etoxilada, además los alquifenoles y los alquifenoles etoxilados son más persistentes que los LAS y que los alcoholes etoxilados (Patterson, 1970; Kravetz, 1991; Salanitro, 1995).

Se han realizado experimentos con NPEO a las concentraciones iniciales: 5, 25 y 50 mg/L. El NPEO utilizado en este trabajo presenta una cadena hidrofóbica formada por 9 átomos de carbono y una cabeza polar con un promedio de 9.5 moléculas de óxido de etileno. La concentración de tensioactivo residual se midió utilizando el método colorimétrico del yodo-yoduro (apartado 3.4.1.3.).

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura V. 40 donde la concentración de tensioactivo se ha expresado como tanto por ciento de tensioactivo residual. Los puntos representan los porcentajes medios experimentales (dos réplicas). Para comprobar la calidad del inóculo, junto con los ensayos de biodegradación, se llevaron a cabo ensayos de biodegradación con un tensioactivo aniónico (LAS) como patrón blando. En todos los casos la biodegradación del LAS fue mayor del 90% a los cinco días, aceptando así la validez de los ensayos (apartado 3.3.1.6.), (UNE 55-844-91).

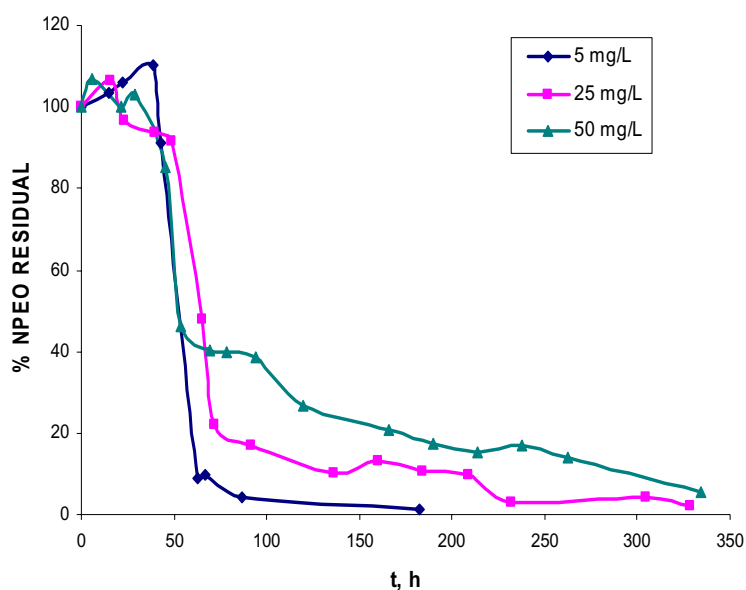


Figura V. 40.- Evolución del porcentaje de NPEO residual en los ensayos de biodegradación para diferentes concentraciones de materia tensioactiva

En la Tabla V. 26 se muestran los parámetros característicos de los perfiles de biodegradación del NPEO (apartado 5.2.3.): concentración inicial de tensioactivo (S_0), tiempo total de duración del ensayo (t_T), biodegradabilidad (B), tiempo de aclimatación (t_L), tiempo de vida media ($t_{1/2}$), velocidad media de biodegradación (V_M) y concentración residual (S_R).

A 5 mg/L el tiempo de adaptación fue de 1.6 días, la biodegradación se alcanzó a los 7.6 días de iniciado el ensayo y fue del 99%. Al aumentar la concentración del ensayo a 25 mg/L los valores fueron respectivamente de 1.7 días, 13 días y 98%. Si la concentración se duplica a 50 mg/L el tiempo de aclimatación aumenta a 1.8 días, la biodegradación disminuye al 95% y el ensayo dura 14 días.

Tabla V. 26.- Parámetros característicos de los perfiles de biodegradación para el NPEO

S_0 , mg/L	t_T , h	B , %	t_L , h	$t_{1/2}$, h	V_M , %/h	S_R , mg/L
5	182.50	58	38.489	52.740	1.41	0.053
25	328.50	17.5	38.757	64.498	0.89	0.528
50	334.25	49	42.563	60.763	0.44	2.439

En todos los perfiles de biodegradación obtenidos y a todas las concentraciones estudiadas, se observa un ligero aumento de la concentración de tensioactivo durante el período de aclimatación o fase de latencia. Este efecto se intentó reducir al mínimo agitando muy bien la disolución de tensioactivo antes de proceder a la toma de muestras.

Los tensioactivos son agentes de superficie y tienden a acumularse en las interfases, adsorbiéndose preferentemente en las paredes del matraz y en la interfase agua-aire. Es muy probable que la adsorción en las interfases sea la causa del aumento de la concentración del NPEO durante la fase de aclimatación de los microorganismos, En el estudio de la biodegradación primaria de alcoholes etoxilados (Jurado, 2002) y del LAS (Jurado, 2004) también se ha observado este comportamiento. Parece ser que este efecto es más acusado cuanto menor es la tensión superficial del tensioactivo.

Para comprender mejor lo que ocurre durante el proceso de biodegradación, junto con los perfiles de biodegradación primaria, se han obtenido las curvas de crecimiento de microorganismos. El número de microorganismos viables se obtuvo mediante recuento heterótrofo en placa (apartado 3.4.2.), expresándose el resultado como unidades formadoras de colonias por ml (UFC/ml). En la Tabla V. 27 se muestran los parámetros característicos de las curvas de crecimiento para las concentraciones estudiadas. k e Y_{ap} se han obtenido de acuerdo con el procedimiento descrito en el apartado 5.2.5.

Tabla V. 27.- Parámetros característicos de las curvas de crecimiento para el NPEO

S_0 , mg/L	X_0 , UFC/ml	UFC/ml _{max}	k , h ⁻¹	Y_{ap} , UFC/g sustrato
5	$5.80 \cdot 10^3$	$6.95 \cdot 10^5$	0.146	$1.92 \cdot 10^5$
25	$4.50 \cdot 10^2$	$3.24 \cdot 10^6$	0.190	$1.95 \cdot 10^5$
50	$1.75 \cdot 10^3$	$5.47 \cdot 10^6$	0.144	$2.15 \cdot 10^5$

La Figura V. 41 muestra las curvas de crecimiento de los microorganismos a las tres concentraciones estudiadas junto con sus perfiles de biodegradación correspondientes.

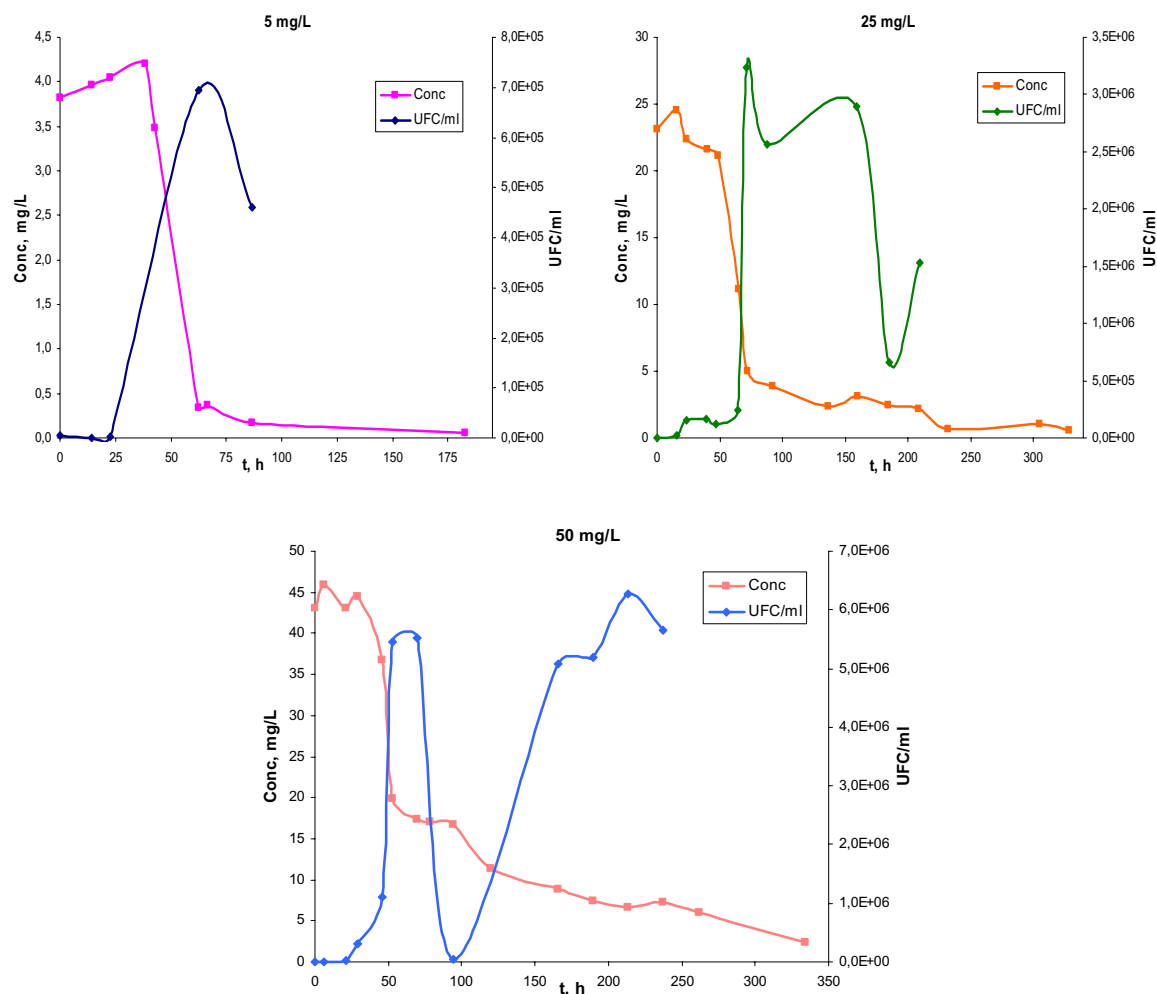


Figura V. 41.- Curvas de crecimiento de microorganismos y perfiles de biodegradación primaria para el NPEO a diferentes concentraciones iniciales de ensayo

Un análisis preliminar de las curvas de biodegradación (Figura V. 40) confirma que la concentración de NPEO afecta a la forma de la curva obtenida, a la velocidad media de biodegradación (Tabla V. 26) y al porcentaje de biodegradación alcanzado (Figura V. 40). Sin embargo, no afecta significativamente al tiempo de aclimatación de los microorganismos, variando éste entre 38.48 horas para el ensayo de 5 mg/L y 42.56 horas para el ensayo de 50 mg/L.

Los períodos de aclimatación para NPEO suelen ser inferiores que los encontrados por otros autores para otros tensioactivos tales como el LAS (Larson, 1981). La causa es que probablemente las enzimas activas para el NPEO son enzimas hidrolíticas que ya están presentes en el medio o son sintetizadas relativamente rápido, mientras que en el caso del LAS, las enzimas son mas específicas y el tiempo para sintetizarlas es mayor.

Para el ensayo de 5 mg/L la curva de biodegradación presenta una forma sigmoideal y la curva de crecimiento tiene forma de campana, alcanzándose el máximo de UFC/ml justo cuando se completa la biodegradación (a los 3 días de iniciado el ensayo). Este comportamiento recuerda a las curvas típicas del modelo de Monod (Monod, 1949).

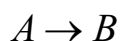
Para el ensayo de 25 mg/L la curva de biodegradación también es sigmoideal, recordando las cinéticas de Monod con un cambio brusco de la concentración de tensioactivo residual tras el período de adaptación. El 64 % de la biodegradación primaria se produce en apenas 24 horas (entre el segundo y tercer día de ensayo). Durante este período de caída brusca de la concentración las curvas de crecimiento de los microorganismos muestran un crecimiento exponencial y posteriormente una fase en la que la densidad de población se mantiene constante en torno a $2.90 \cdot 10^6$ UFC/ml, al mismo tiempo que se produce una caída lineal de la concentración que sugiere una cinética de orden cero. Se puede asumir que durante este período se está produciendo una inhibición de los microorganismos cuando aún no se ha completado la biodegradación del tensioactivo. Este hecho apunta a una inhibición del crecimiento de los microorganismos debido a la acumulación de los subproductos de biodegradación. Asumiendo que el mecanismo que tiene lugar es la hidrólisis no oxidativa del NPEO (Jonkers, 2004) para dar cadenas cortas de nonilfenol etoxilado (nonilfenol dietoxilado, nonilfenol monoetoxilado y nonilfenol) esto hace pensar que estos subproductos de degradación resultan tóxicos para los microorganismos del ensayo.

Cuando se aumenta la concentración a 50 mg/L se reproduce el mismo patrón de comportamiento. El 40% de la biodegradación primaria tiene lugar en apenas 24 horas (durante el segundo y tercer día de ensayo) y continúa con una disminución lineal de la concentración del tensioactivo residual, período durante el cual la densidad de población se mantiene constante. Tanto para el ensayo de 25 mg/L como para el de 50 mg/L se observa que finalizada la biodegradación primaria del tensioactivo, la curva de crecimiento evidencia una segunda etapa de crecimiento exponencial en la que se inicia la biodegradación de los metabolitos resultantes del proceso de biodegradación, posiblemente debido a la adaptación de nuevos microorganismos.

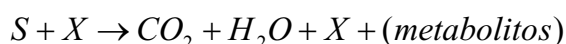
5.3.2. ESTUDIO CINÉTICO DE LA BIODEGRADACIÓN PRIMARIA DEL NPEO

Frecuentemente para analizar los perfiles de biodegradación correspondientes a tensioactivos no iónicos se utiliza una cinética de primer orden (Zhang, 1999), sin embargo la aplicación de este modelo a los perfiles de biodegradación del NPEO no justifica la dependencia experimental observada por dos razones: no se contempla la existencia de un periodo inicial de adaptación de los microorganismos al sustrato y la función exponencial del tipo e^{-kt} no explica la disminución de la concentración observada.

Este hecho es lógico si tenemos en cuenta que los procesos de primer orden responden a modelos en los que solo se tiene en cuenta la sustancia ensayada del tipo:



Sin embargo, para que tenga lugar el proceso de biodegradación es necesaria la intervención sobre la sustancia a ensayar de una serie de microorganismos (X) que transformen el tensioactivo de partida (S) en nuevos microorganismos, anhídrido carbónico y agua si la biodegradación es total, o microorganismos, anhídrido carbónico, agua y metabolitos, si la biodegradación es parcial:



Un análisis preliminar de los perfiles de biodegradación primaria obtenidos (Figura V. 40) demuestra que las funciones de tipo sigmoideal justifican bien la dependencia experimental observada, y esto nos lleva a buscar modelos que tengan en cuenta la tasa de crecimiento específica de los microorganismos.

Para comprobar la hipótesis de Gaden se aplica la Ecuación V. 39 hasta la primera etapa de crecimiento exponencial de los microorganismos utilizando los parámetros X_0 e Y_{ap} mostrados en la Tabla V. 27. Los resultados se presentan en la Figura V. 42 donde se

observa que puede considerarse válida la expresión propuesta por Gaden en nuestras condiciones experimentales.

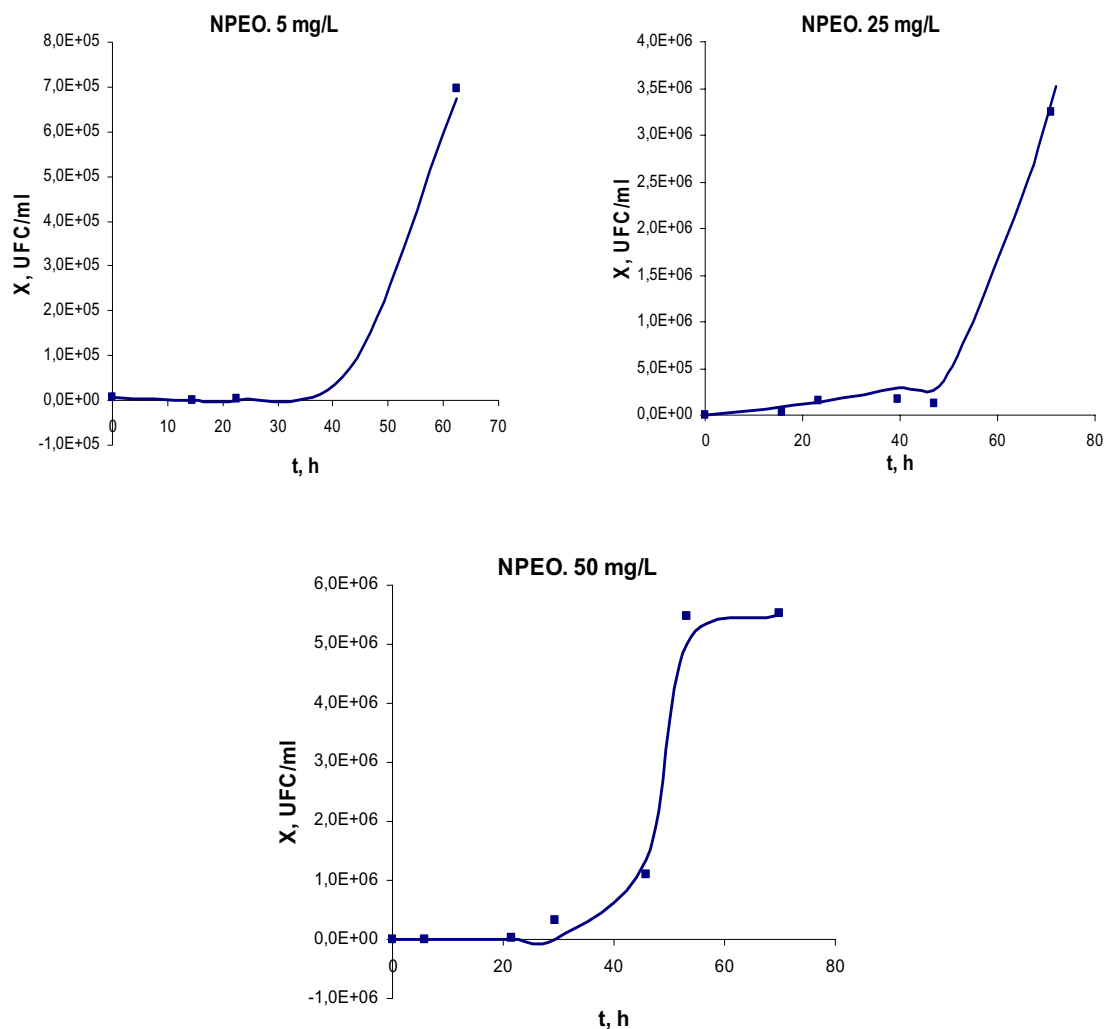


Figura V. 42.- Comparación entre los resultados experimentales y calculados del crecimiento de microorganismos el NPEO a diferentes concentraciones iniciales

Para el nonilfenol polietoxilado se ha aplicado el modelo cinético para sustratos que soportan el crecimiento de microorganismos, modelo de Monod considerando una concentración de tensioactivo residual (Ecuación V. 58). Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla V. 28 donde se muestra también el valor de K_S teniendo en cuenta la relación:

$$\beta_s = \frac{K_s}{S_0}$$

Tabla V. 28.- Parámetros cinéticos del modelo propuesto (Ecuación V. 58) para el NPEO a diferentes concentraciones iniciales

NPEO						
S ₀ , mg/L	α ₀	β _s	μ _m , h ⁻¹	K _s , mg/L	x _m	r
5	8.42 · 10 ⁻⁹	0.341	0.130	1.709	0.956	0.986
25	3.49 · 10 ⁻⁵	0.074	0.013	1.852	0.915	0.994
50	2.38 · 10 ⁻²	0.152	0.010	7.605	0.826	0.970
Parámetros recalculados						
S ₀ , mg/L	α ₀	β _s	μ _m , h ⁻¹	K _s , mg/L	x _m	r
5	1.01 · 10 ⁻⁸	0.356	0.134	1.780	0.959	0.986
25	3.50 · 10 ⁻⁵	0.071	0.012	1.780	0.915	0.994

En la Figura V. 43 se comparan los valores experimentales y los calculados con el modelo, se observa un buen ajuste del modelo aplicado para las concentraciones de 5 y 25 mg/L, y un valor de la constante K_s prácticamente coincidente para estas concentraciones, aunque la velocidad específica máxima de crecimiento disminuye considerablemente con la concentración de tensioactivo ensayada así como la conversión máxima alcanzada, lo que implica una inhibición del crecimiento de microorganismos por efecto de la concentración.

Se ha tomado un valor medio de K_s para las concentraciones de 5 y 25 mg/L, se impone este valor y se recalculan de nuevo el resto de los parámetros cinéticos. Para estas concentraciones, los resultados obtenidos se muestran también en la Tabla V. 28. Para la concentración de 50 mg/L, el ajuste es peor y la constante K_s diferente, lo que implica un comportamiento cinético diferente para estas concentraciones de tensioactivo (concentración superior a la CMC, Tabla III. 1.), al igual que ocurría con los tensioactivos alcoholes grasos etoxilados (apartado 5.2.6.2).

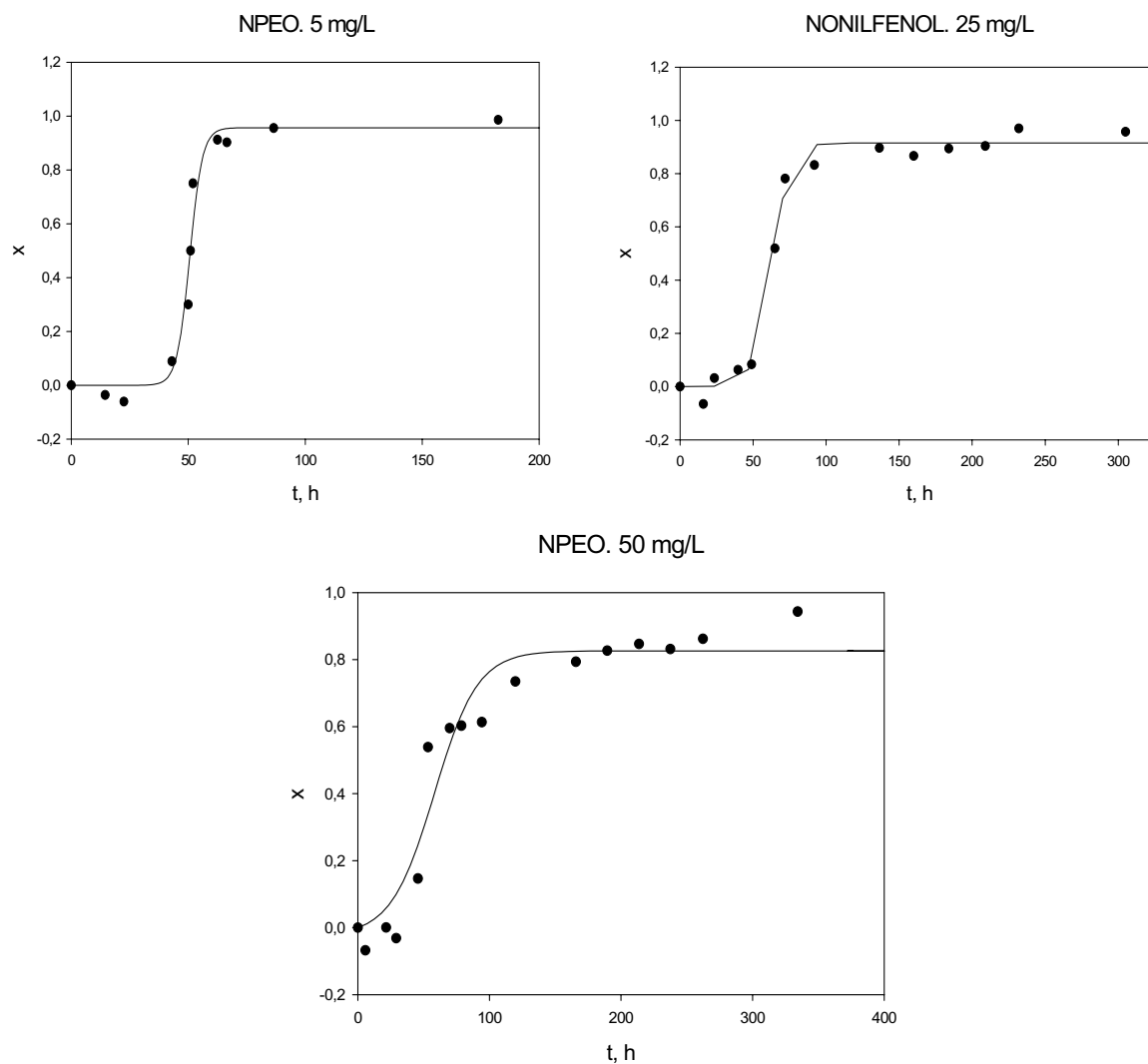


Figura V. 43.- Comparación entre los resultados experimentales y los obtenidos aplicando el modelo propuesto para el NPEO a diferentes concentraciones iniciales

Teniendo en cuenta los parámetros cinéticos evaluados para los perfiles de biodegradación (Tabla V. 28) se ha aplicado el modelo cinético para evaluar el t_L y el $t_{1/2}$ según se indica en el apartado 5.2.6.2. (Ecuación V. 62) y se comparan los parámetros experimentales obtenidos de los perfiles de biodegradación, se observa buena concordancia entre ellos. Los resultados se muestran en la Tabla V. 29 en la que también se indica el valor de la velocidad específica de crecimiento (μ) calculada según la Ecuación V. 71 a partir de los perfiles de biodegradación primaria (apartado 5.2.6.2.).

Tabla V. 29.- Comparación entre los parámetros experimentales y los calculados según el modelo propuesto para el NPEO a diferentes concentraciones iniciales

NPEO						
	Parámetros experimentales			Parámetros modelo		
S ₀ , mg/L	t _L , h	t _{1/2} , h	μ, h ⁻¹	t _L , h	t _{1/2} , h	μ _m , h ⁻¹
5	38.48	52.74	0.119	44.71	50.87	0.134
25	38.75	64.49	0.097	49.46	63.45	0.012

En la Figura V. 44 se comparan los valores de conversión experimentales y los calculados con el modelo propuesto para las tres concentraciones ensayadas y los parámetros indicados en la Tabla V. 28, obteniéndose una desviación relativa media de 7.29 % para los ensayos de 5 mg/L y 25 mg/L y 12.92 % para el ensayo de 50 mg/L.

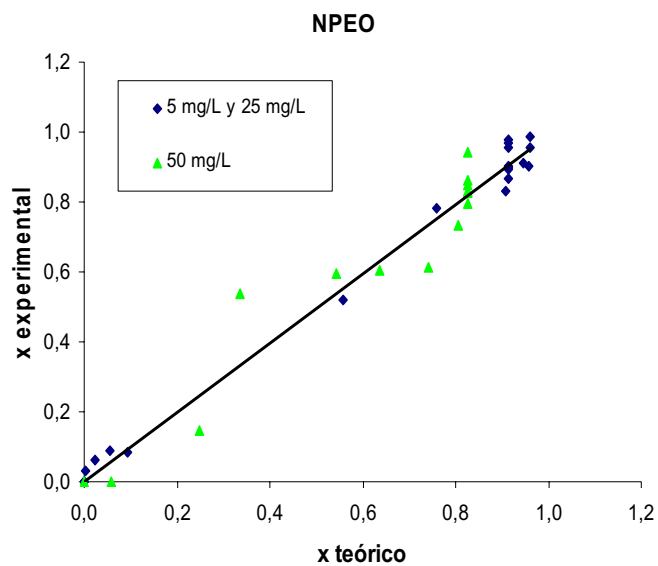


Figura V. 44.- Comparación entre los valores de conversión experimentales y calculados según el modelo propuesto para el NPEO a diferentes concentraciones

En la Tabla V. 30 se muestran los parámetros cinéticos resultantes de la aplicación del modelo de Andrews (modelo general y con una concentración de sustrato no biodegradable, Tabla V. 24) para el ensayo de 50 mg/L. La aplicación de este modelo nos proporciona la constante de inhibición K_i que se ha obtenido utilizando el valor de β_i obtenido en el ajuste a partir de la siguiente expresión:

$$\beta_i = \frac{S_0}{K_i}$$

Tabla V. 30.- Parámetros cinéticos del modelo de Andrews para el NPEO a 50 mg/L

NPEO							
S_0 , mg/L	α_0	β_s	μ_m , h ⁻¹	β_i	K_i , mg/L	x_m	r
50	94.457	67.739	$6.90 \cdot 10^{-2}$	0.400	125	0.978	0.970

5.4. BIODEGRADACIÓN DE TENSIOACTIVOS DURANTE EL ENSAYO DINÁMICO

Para comprobar la biodegradabilidad de los tensioactivos alcoholes grasos etoxilados se realizaron experimentos de confirmación mediante el ensayo dinámico para los tensioactivos Findet 1618A/18 y Findet 1214N/23. La estructura y modo de operación del ensayo aparecen descritos en el apartado 3.3.2. Los resultados de concentración de tensioactivo, biodegradabilidad, oxígeno disuelto, concentración de sólidos en suspensión, DBO y DQO obtenidos durante estos ensayos aparecen en la Tabla IV. 5 y Tabla IV. 11 para los tensioactivos ensayados.

El ensayo dinámico o de confirmación, un ensayo continuo que simula las condiciones de operación de una planta biológica que opera mediante fangos activados, fue desarrollado por Husmann en 1962 (Husmann, 1962) para la determinación de la biodegradabilidad de detergentes. Posteriormente éste método se convirtió en el ensayo recomendado por la OCDE (OECD, 1971; 1976). Además en las correspondientes guías de ensayo (CEE, 1982) el ensayo de confirmación aparece como uno de los ensayos para la determinación de la biodegradabilidad de tensioactivos.

5.4.1. PUESTA EN MARCHA DE LA INSTALACIÓN

Para la puesta en marcha de la instalación se inoculó el agua de alimentación con agua residual sintética procedente del clarificador secundario de la estación depuradora de aguas residuales urbanas “Los Vados” de Granada (EDAR “Los Vados”) a razón de 200 ml por litro de agua residual sintética. El agua tratada de la EDAR proporciona una amplia variedad de microorganismos aerobios necesarios para que el proceso biológico tenga lugar.

Una vez que se ha preparado el agua de alimentación, se pone en marcha la bomba de alimentación al reactor, la aireación y la recirculación. Los parámetros de operación del reactor se fijan en los siguientes valores:

- Caudal de alimentación de 1 L/h.

- Caudal de recirculación del 100% (medido respecto del caudal de alimentación).
- Caudal de aire suficiente para que la concentración de oxígeno sea mayor de 2 mg/L.

Se deja funcionando el sistema hasta que se alcanza una concentración de fangos en el reactor de 3 ± 0.5 g/L. Llegado a éste punto se empieza a extraer fango para mantener la concentración de éste en el valor deseado.

En estas condiciones de funcionamiento los valores de la carga másica y del tiempo de retención hidráulico del reactor son, respectivamente, 0.53 y 3 horas.

Durante la fase de puesta en marcha de la instalación se midieron con relativa frecuencia el pH, la DQO, la DBO₅ y los SS del agua de alimentación (de ahora en adelante agua bruta, AB) y del agua de salida (de ahora en adelante agua tratada, AT). En el reactor se midieron la concentración de fangos como sólidos en suspensión (MLSS), el oxígeno disuelto y la temperatura. De igual forma se comprobó tanto el caudal de alimentación como el de recirculación. Los datos concretos del seguimiento de la puesta en marcha se presentan en la Tabla V. 31.

Como puede apreciarse en la Tabla V. 31, las condiciones de operación del reactor se alcanzan en los 24 primeros días de funcionamiento. La concentración de fango aumenta progresivamente desde un valor inicial de 18 p.p.m. a 2400 p.p.m. el día 24. Como era de esperar, el aumento de la concentración de fango en el reactor es paralelo a un aumento del rendimiento de eliminación de DQO (R_{DQO}) que pasa de un valor inicial del 10% a un valor del 96% cuando se ha alcanzado el estado estacionario. La temperatura del sistema se mantuvo en un valor aproximadamente constante de 25°C.

Antes de proceder al estudio de la biodegradación del tensioactivo se deja funcionar un tiempo el sistema en estado estacionario y el día 49 se inicia el ensayo de biodegradación con la adición del tensioactivo a una concentración de 10 mg/L.

Tabla V. 31.- Valores diarios de DQO, DBO₅, SS y pH del agua bruta y del agua tratada correspondientes al ensayo dinámico. Variación del oxígeno disuelto, T y concentración de sólidos (MLSS) del reactor

Día	AGUA BRUTA					AGUA TRATADA					REACTOR			R _{DQO} %
	Q(L/h)	pH	DQO	DBO ₅	SS	pH	DQO	DBO ₅	SS	pH	O ₂	T	MLSS	
1	1.14	7.57	297	-	11	7.56	267	-	16	8	7.1	-	18	10.1
2	1.18	7.84	364	-	24	7.76	201	-	23	8	4.2	-	50	44.8
3	1.13	7.66	321	-	10	8.30	111	-	18	8.2	5.5	-	45	65.4
4	1.29	7.2	281	-	12	7.40	107	-	12	7.3	1.8	-	240	61.9
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	0.51	7.52	-	-	10	7.90	-	-	20	7.6	3.4	-	270	-
8	0.86	7.62	-	-	12	8.20	-	-	10	8	3.6	-	870	-
9	1.06	8.07	-	-	16	8.00	-	-	38	7.4	3.0	-	880	-
10	0.99	7.74	-	-	40	8.00	-	-	36	7.9	3.2	-	840	-
11	0.81	7.68	284	-	16	8.20	214	-	62	7.5	3.8	-	950	24.6
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	0.52	8.1	210	-	8	8.30	94	-	12	8.3	7.9	-	730	55.2
15	1.00	8.17	334	-	8	8.30	160	-	18	7.8	6.2	-	1060	52.1
16	1.10	7.44	310	-	22	7.90	254	-	14	7.8	3.1	-	1490	18.1
17	1.05	7.91	271	-	16	7.80	35	-	-	7.6	0.3	-	1540	87.1
18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	0.97	7.83	228	-	18	7.90	151	-	46	7.6	4.7	-	2090	33.8
22	1.01	7.37	284	-	14	8.20	-	-	-	8.1	6.2	-	2300	-
23	1.06	7.54	261	215	20	8.10	41	10	-	8.1	6.7	-	2270	84.3
24	1.09	7.47	271	-	12	8.30	38	-	23	8.1	4.8	-	2400	86.0
25	1.11	8.16	248	-	12	8.60	25	-	13	8.3	4.5	-	1980	89.9
26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	0.98	8.57	208	-	12	8.30	85	-	12	7.8	6.2	-	1870	59.1
29	1.01	7.6	191	-	6	8.20	111	-	56	7.8	5.6	-	1900	41.9
30	1.20	7.8	301	242	10	8.40	41	13	14	8.2	5.4	-	2390	86.4
31	0.94	8.2	281	-	35	8.50	55	-	22	7.7	4.3	-	2360	80.4
32	0.82	8	325	-	14	8.40	115	-	24	8.2	4.4	-	2350	64.6
33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35	1.09	7.7	251	-	8	8.20	71	-	6	7.9	6.5	-	3530	71.7
36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6.2	23.8	3880	-
37	-	-	268	172	-	-	44	7	-	-	6.1	23.8	4100	83.6
38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6.9	24.4	1750	-
39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2653	-
43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3467	-
44	-	-	288	-	-	-	61	5	-	-	7.3	22.6	2400	78.8
45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
46	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
47	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
49	-	-	321	-	-	-	65	-	-	-	5.8	25.6	2730	79.8
50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5.9	-	2800	-

El porcentaje de biodegradación primaria de los tensioactivos ensayados se determinó diariamente a partir de las concentraciones de tensioactivo en el agua residual sintética que entra en la planta y en el efluente acumulado en el depósito de recogida durante 24 horas. El método analítico aplicado para la determinación de la concentración de tensioactivo residual fue el método de Wickbold, expresándose la concentración como BiAS. Para el tensioactivo Findet 1214N/23 se utilizó el método espectrofotométrico, y para el tensioactivo Findet 1618A/18 la medida de la concentración se realizó mediante el método potenciométrico.

En la Figura V. 45 aparece representado el porcentaje de biodegradación calculado diariamente según la Ecuación III. 3 y la concentración residual expresada como mg/L de BiAS. La concentración residual para los dos tensioactivos ensayados es muy baja, lo cual indica una excelente biodegradación primaria para estos tensioactivos. El nivel de concentración residual permaneció prácticamente constante durante todo el experimento. Además es muy significativo el hecho de que la biodegradación primaria no requiere ningún período de adaptación de los microorganismos al tensioactivo. Resultados similares fueron obtenidos por Szymanski y col., (Szymanski, 2000) en un ensayo con alcoholes grasos etoxilados en el que por contra si se obtuvo un período de adaptación para los metabolitos.

Los valores de biodegradación, se mantienen aproximadamente constantes, resultando una biodegradación media del $(98.76 \pm 0.49) \%$ ($n=21$) para el Findet 1214N/23 y $(98.22 \pm 0.55) \%$ ($n=21$) para el Findet 1618A/18. El tiempo total de duración del ensayo fue de 23 días para el tensioactivo Findet 1214N/23 y 24 días para el tensioactivo Findet 1618A/18.

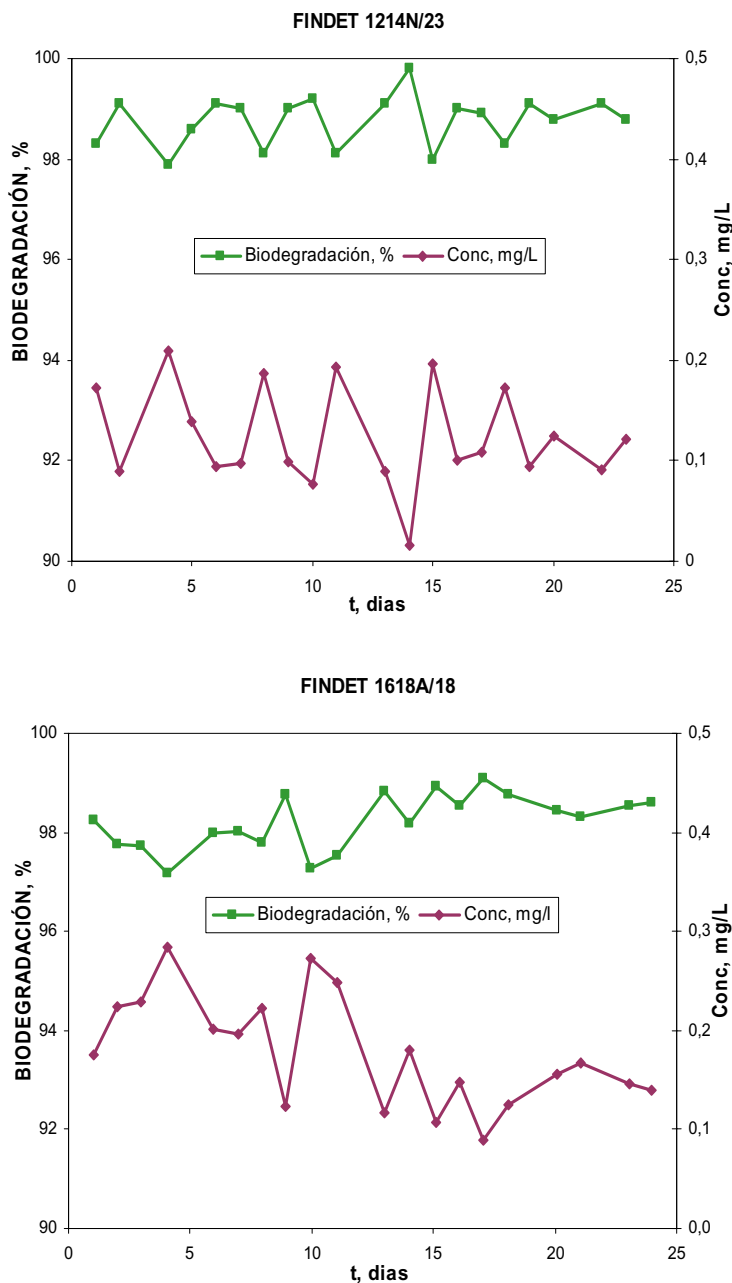


Figura V. 45.- Evolución de la concentración de tensioactivo y del porcentaje de biodegradación en el ensayo dinámico

La comprobación de la eficacia del proceso de biodegradación durante el ensayo dinámico se realizó determinando la diferencia entre los valores de la DQO, al menos dos veces por semana, y la DBO correspondientes al agua residual sintética inicial y al filtrado del efluente contenido en el colector. En la Figura V. 46 se presenta la evolución de la DQO y DBO para el tensioactivo Findet 1214N/23, ambos expresados en mgO₂/L. La

DQO mostró una disminución media del 96% y el valor de disminución para la DBO fue del 97%. Se observa una disminución importante de los niveles de contaminación del agua una vez que ésta ha sido tratada durante el ensayo dinámico de biodegradación que simula el comportamiento de una EDAR.

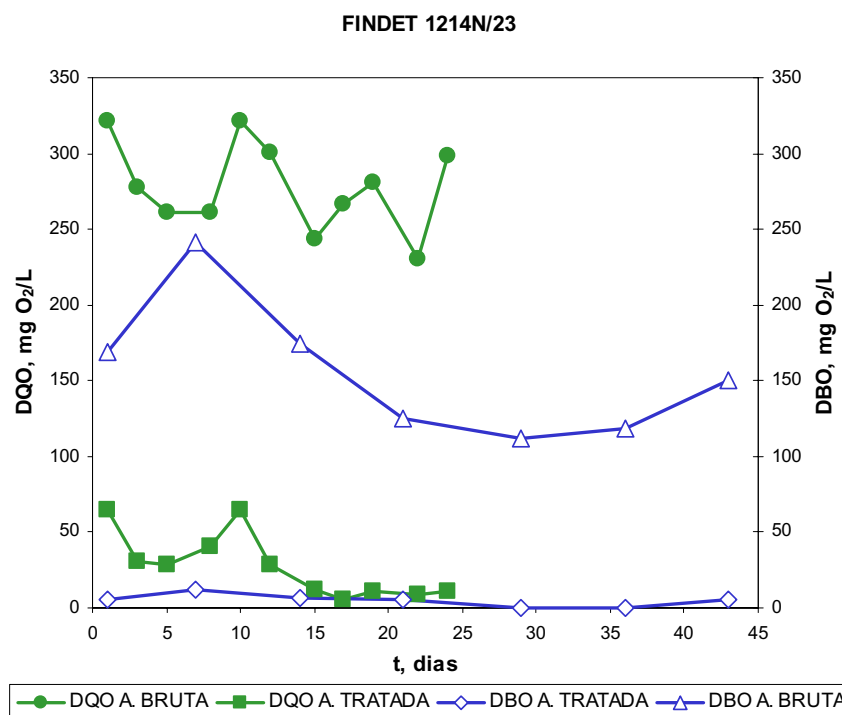


Figura V. 46.- Evolución de la DBO y DQO con el tiempo para el tensioactivo Findet 1214N/23 durante el ensayo dinámico

La materia seca existente en el lodo activo contenido en el recipiente de aireación debe determinarse, en gramos por litro, dos veces por semana. Si hay más de 3 g/L, el exceso de lodo activo debe retirarse purgando en el decantador la cantidad de fango que sea necesaria. En Figura V. 47 se presenta la evolución los sólidos en suspensión y del oxígeno disuelto y para los dos tensioactivos ensayados. Durante el ensayo dinámico se mantiene una velocidad de flujo de la corriente de aire que entra en el recipiente de aireación tal que la concentración de oxígeno disuelto se mantenga entre 3-4 mg/L.

Tanto el nivel medio de oxígeno disuelto como la concentración de sólidos en suspensión para el experimento realizado con el tensioactivo Findet 1214N/23 se han mantenido constantes en 4.70 mg/L y 2.55 g/L respectivamente. Para el experimento realizado con el tensioactivo Findet 1618A/18 los valores medios alcanzados han sido 3.74

mg/L y 2.77 g/L respectivamente. Se trata de niveles adecuados para el buen funcionamiento de la instalación en ambos casos.

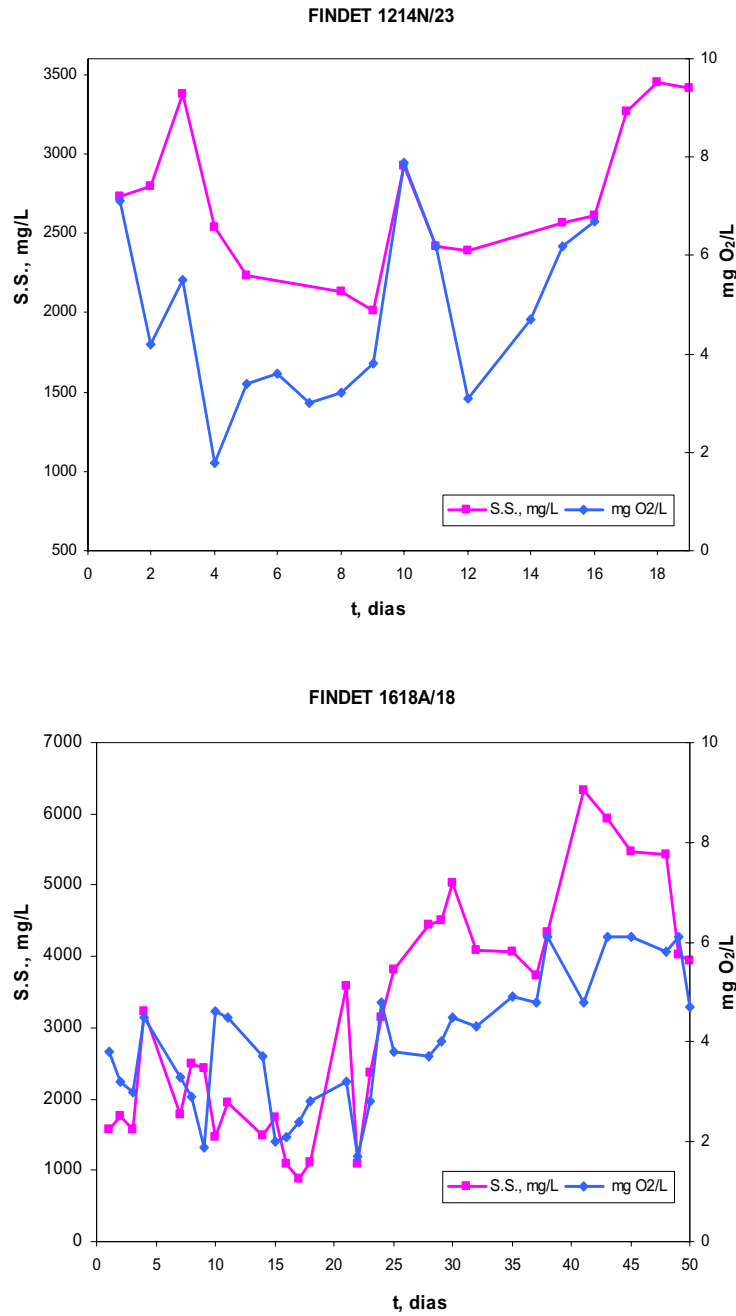


Figura V. 47.- Evolución de los sólidos en suspensión y el oxígeno disuelto con el tiempo para los tensioactivos Findet 1214N/23 y Findet 1618A/18 durante el ensayo dinámico

5.5. BIODEGRADACIÓN DE ALQUILPOLIGLUCÓSIDOS

Los alquilpoliglucósidos pertenecen a una familia de tensioactivos no iónicos cuyo resto apolar es una cadena hidrocarbonada y cuya cabeza polar está formada por un polímero de moléculas de glucosa. El número de unidades de *D*-glucosa varía entre 1 y 5. La cadena alquílica contiene entre 6 y 18 átomos de carbono. Durante los últimos 15 años ha aumentado mucho el interés por estos tensioactivos debido a su compatibilidad y efecto sinérgico cuando se combinan con otros tensioactivos, así como a su baja toxicidad y mínimo impacto ambiental. Por tanto, dado el potencial futuro que pueden alcanzar y su amplia distribución en el medio ambiente acuático, es esencial que este grupo de tensioactivos sean compatibles con los sistemas de tratamiento de aguas residuales para que no causen efectos adversos en el medio ambiente.

La biodegradación es el principal mecanismo de eliminación de los compuestos orgánicos en el medio ambiente. El conocimiento de la biodegradabilidad y toxicidad de tensioactivos es una necesidad para la decisión de su inclusión en formulaciones detergentes, ya que estos compuestos están siendo sometidos cada vez a controles medioambientales más estrictos. Al tratarse de una nueva clase de tensioactivos, son muy escasos los estudios encaminados a conocer la biodegradabilidad de los APG.

Aunque los APG son tensioactivos no iónicos, no se comportan como sustancias activas al yoduro de bismuto, por lo tanto el criterio de la legislación europea para considerar un tensioactivo biodegradable ($\geq 80\%$ de eliminación de BiAS), no es aplicable para este tipo de tensioactivos.

Para el estudio de la biodegradabilidad de los APG se han seleccionado dos tipos de ensayos, el método de la botella cerrada y el método manométrico respirométrico. En el primero se sigue la evolución de la biodegradación a partir de medidas de oxígeno disuelto (apartado 3.3.4.) y en el segundo se mide la DBO utilizando la técnica de respirometría manométrica (apartado 3.3.3.). La medida de la DBO tiene la ventaja de que es un parámetro biológico que mide directamente la degradación aerobia, (Reuschenbach, 2003). Este último método se utiliza para determinar la biodegradabilidad final o mineralización de los APG. En la Tabla V. 32 se muestran y comparan los diferentes métodos utilizados. Además se describen las principales características del ensayo estático que se utilizó para obtener las curvas de crecimiento de microorganismos.

Tabla V. 32.- Diferentes métodos de ensayo para medir la biodegradabilidad de APG

MÉTODO DE ENSAYO	CONDICIONES Y CARACTERÍSTICAS
ENSAYO ESTÁTICO	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Tensioactivo: única fuente de carbono ▪ Inóculo: población mixta no adaptada ▪ 25 °C ▪ Oscuridad
MÉTODO DE LA BOTELLA CERRADA	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Tensioactivo: única fuente de carbono ▪ Inóculo: población mixta no adaptada ▪ Concentración < 10 mg/L (2-5 mg DO_T/L) ▪ Ensayo limitado por las bajas concentraciones ▪ 25 °C ▪ Oscuridad ▪ Densidad celular inicial: $1.36 \cdot 10^3$ y $3.17 \cdot 10^3$ UFC/mL ▪ Condiciones de difícil biodegradación
MÉTODO RESPIROMÉTRICO MANOMÉTRICO	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Tensioactivo: única fuente de carbono ▪ Inóculo: población mixta no adaptada ▪ Concentración ~ 100 mg/L (50-100 mg DO_T/L) ▪ 25 °C ▪ Oscuridad

En todos los métodos se utiliza una disolución nutriente de tensioactivo que es la única fuente de carbono y como inóculo una población mixta de microorganismos no adaptados procedentes del efluente secundario de una EDAR que opera principalmente con aguas residuales urbanas.

Para el estudio de la biodegradación de los APG se han utilizado tres tensioactivos comerciales: GCP 215 CS UP, GCP 600 CS UP y GCP 650 EC. Las propiedades de estos tensioactivos comerciales se muestran en la Tabla III. 1. del apartado Materiales y Métodos.

5.5.1. BIODEGRADACIÓN DE APG POR EL MÉTODO DE LA BOTELLA CERRADA

En la Figura V. 48 se representan las curvas de biodegradación obtenidas para los APG ensayados cuando se someten al ensayo de la botella cerrada. Las concentraciones estudiadas han sido: 12 mg/L para todos los APG, 20 mg/L para el GCP 650 y 100 mg/L para el GCP 600.

En la Tabla V. 33 se proporciona la equivalencia entre la concentración de tensioactivo expresada en mg/L, y su concentración expresada como demanda teórica de oxígeno ($\text{mg DO}_T/\text{L}$) y en miligramos de carbono por litro (mg C/L). La demanda teórica de oxígeno y la cantidad de carbono se han calculado utilizando las fórmulas empíricas de los tensioactivos de la Tabla III. 1. (apartado 3.1. de Materiales y Métodos) obtenidas en un trabajo anterior.

En la Tabla V. 33 también se muestran las concentraciones iniciales de oxígeno disuelto ($[\text{O}_2]_i$) en cada uno de los ensayos. Se asume como concentración inicial la alcanzada una vez finalizada la disminución brusca de concentración de oxígeno disuelto debido a la atemperación de la muestra a las condiciones del ensayo (25°C).

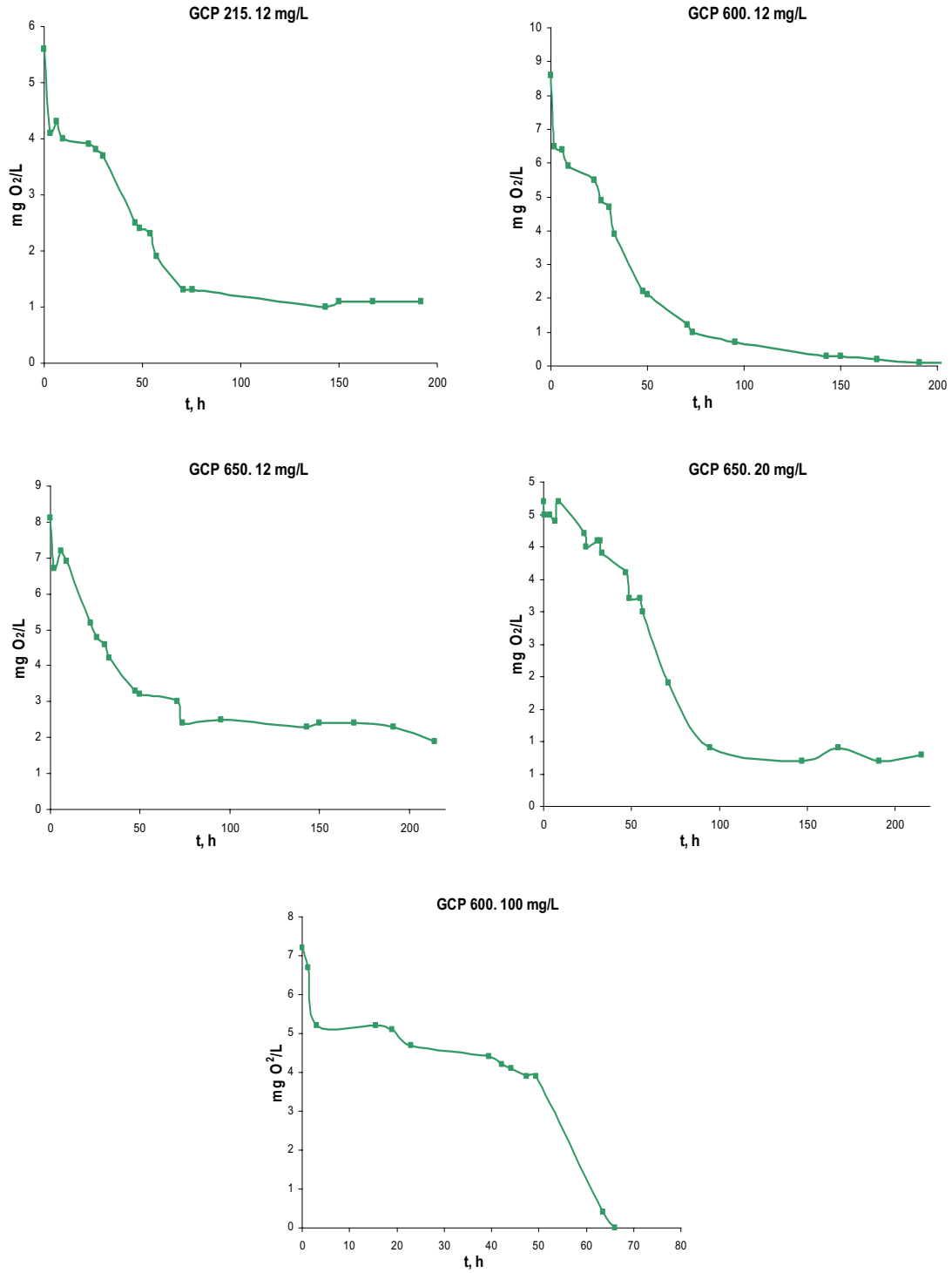


Figura V. 48.- Curvas de degradación para los APG mediante el método de la botella cerrada

Tabla V. 33.- Equivalencia entre la concentración de los APG en mg/L y su concentración expresada como demanda teórica de oxígeno y en mg C/L. También se indica la concentración de oxígeno inicial en los ensayos

S_0 , mg/L	GCP 215			GCP 600			GCP 650		
	mg DO _T /L	mg C/L	[O ₂] _i , mg/L	mg DO _T /L	mg C/L	[O ₂] _i , mg/L	mg DO _T /L	mg C/L	[O ₂] _i , mg/L
12	14.42	4.27	4.0	13.19	3.92	5.9	12.09	3.49	5.2
20	--	--	--	--	--	--	20.15	5.81	4.0
100	--	--	--	109.91	32.65	5.2	--	--	--

Se observa que la concentración de oxígeno inicial es inferior a la DO_T del tensioactivo, por lo que en principio no es posible estudiar la biodegradación total (ó última) del tensioactivo en este ensayo, sin embargo el estudio preliminar de la biodegradación de los APG por el método de la botella cerrada puede servir de referencia para evaluar la biodegradabilidad primaria de estos tensioactivos.

Como se aprecia en la Figura V. 48, todas las curvas de biodegradación obtenidas tienen forma sigmoideal (de “s“ invertida) y están precedidas por una fase de latencia inicial. Finalizada la etapa de biodegradación del compuesto, la concentración de oxígeno disuelto se mantiene constante y en un valor superior a los 0 mg/L en todos los casos a excepción de las curvas obtenidas a 20 mg/L (GCP 650) y a 100 mg/L (GCP 600).

A partir de los perfiles obtenidos se ha estimado el tiempo de latencia (t_L) tiempo transcurrido desde que se alcanza la concentración inicial de oxígeno y el inicio del proceso de biodegradación y el tiempo de degradación (t_D), tiempo transcurrido desde que finaliza la fase de latencia hasta que finaliza la degradación (cuando la concentración de oxígeno disuelto se mantiene constante). También se estima el % de mineralización alcanzado (Min) a partir de la expresión:

$$Min(\%) = \frac{[O_2]_i - [O_2]_f}{DO_T} \cdot 100$$

Ecuación V. 82

Donde [O₂]_i y [O₂]_f son la concentración de oxígeno disuelto inicial y final de la curva de biodegradación.

También se han calculado los parámetros característicos de los perfiles de biodegradación a partir de las curvas de oxígeno disuelto, expresando éstas en forma de conversión de acuerdo con:

$$x = \frac{((O_t - O_f) - O_i)}{O_i}$$

Ecuación V. 83

donde O_t es la cantidad de oxígeno disuelto consumido en un tiempo t , y O_i y O_f el oxígeno disuelto consumido al inicio y final del ensayo respectivamente.

En la Tabla V. 34 se muestran los parámetros obtenidos del análisis de las curvas de oxígeno disuelto: biodegradabilidad (B) y la velocidad media de biodegradación (V_M) obtenidos tal como se describe en el apartado 5.2.3. Se observa que el tiempo de latencia es prácticamente constante para todos los ensayos realizados y no se modifica de forma apreciable ni con el tensioactivo ni con la concentración. Sin embargo, el tiempo de degradación sí parece depender del tensioactivo ensayado, siendo más elevado para el GCP 650. El porcentaje de mineralización es mayor para el alquilpoliglucósido de mayor cadena carbonada GCP 600 afectándole considerablemente la concentración de tensioactivo ensayada.

Tabla V. 34.- Parámetros obtenidos de las curvas de oxígeno disuelto

GCP 215					
S₀, mg/L	t_L, h	t_D, h	Min (%)	B	V_M, h⁻¹
12	26.50	44.50	17.34	58	1.328
GCP 600					
S₀, mg/L	t_L, h	t_D, h	Min (%)	B	V_M, h⁻¹
12	26.0	69.25	30.90	65	1.148
100	23.0	47.00	4.60	27	1.370
GCP 650					
S₀, mg/L	t_L, h	t_D, h	Min (%)	B	V_M, h⁻¹
12	22.25	51.25	23.15	74	1.181
20	24.25	70.50	15.38	30	1.049

Aunque la DO_T del tensioactivo sea mayor que la concentración de oxígeno disuelto disponible, la evolución de las curvas de biodegradación obtenidas por este método parece sugerir que la biodegradación observada podría corresponder a la biodegradación primaria del tensioactivo, esto es, a una ruptura parcial de la molécula y no a una mineralización del compuesto a CO_2 más H_2O . Para comprobar este hecho se analizan las curvas de crecimiento de microorganismos obtenidas en un ensayo estático de biodegradación.

5.5.2. CRECIMIENTO DE LA BIOMASA DURANTE EL PROCESO DE BIODEGRADACIÓN

Simultáneamente a los ensayos de biodegradación por el método de la botella cerrada, se estudió el crecimiento de microorganismos, para lo cual se realizaron una serie de ensayos estáticos de biodegradación (apartado 3.3.1.) con concentraciones iniciales de tensioactivo entre 12 y 100 mg/L y se analizó el crecimiento de la biomasa durante el proceso de biodegradación. La densidad de población se midió mediante el recuento heterótrofo en placa (apartado 3.4.2.).

En la Figura V. 49 se recogen las curvas de crecimiento para cada uno de los APG y a las concentraciones ensayadas.

De la misma forma que para los AGE, las curvas experimentan un crecimiento inicial rápido y una disminución brusca cuando se biodegrada el tensioactivo, llegando a ser prácticamente despreciable la biomasa existente. Posteriormente tras un proceso de aclimatación de los microorganismos a los productos intermedios formados, se inicia de nuevo el crecimiento de los mismos. También se detecta que a concentraciones de tensioactivo altas y en los tiempos ensayados no se observa una disminución importante de las unidades de colonias formadas durante el proceso de biodegradación.

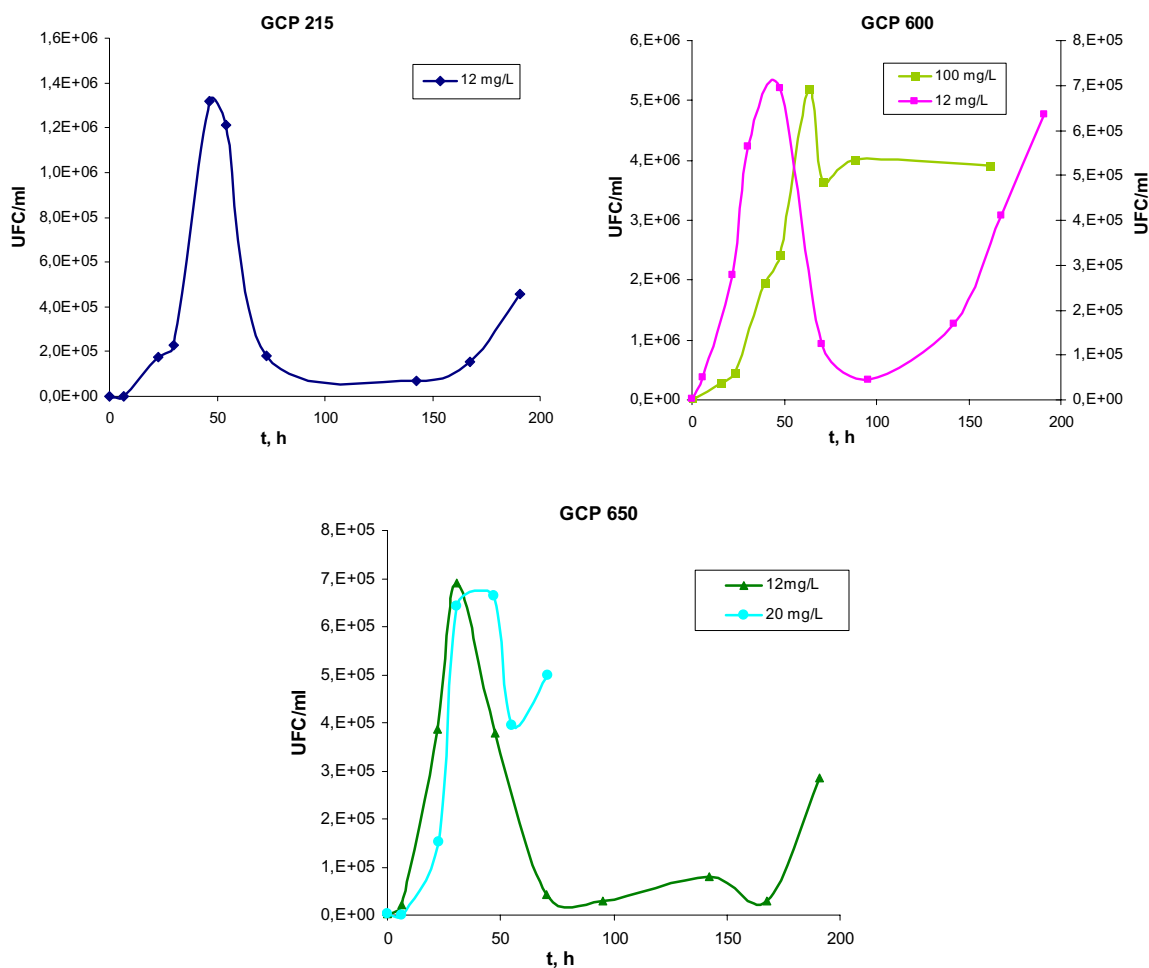


Figura V. 49.- Evolución del número de UFC/ml durante los ensayos de biodegradación para los APG estudiados a diferentes concentraciones iniciales

En la Figura V. 50 se comparan los resultados del crecimiento de biomasa obtenidos para los diferentes APG ensayados a la concentración inicial de 12 mg/L. Se observa que las curvas de crecimiento presentan valores máximos cuando la longitud de la cadena carbonada es menor (GCP 215), no existiendo diferencias importantes para GCP 650 y GCP 600.

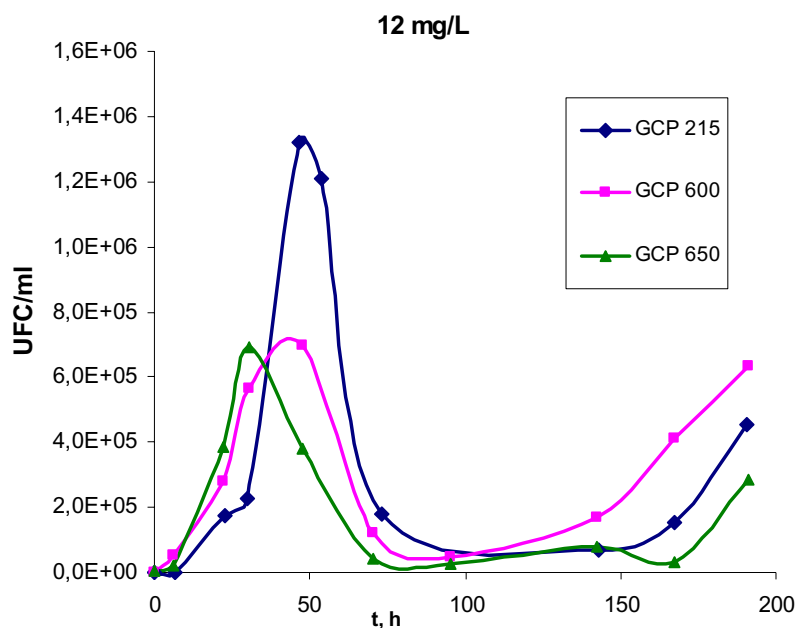


Figura V. 50.- Curvas de crecimiento de biomasa para los diferentes APG ensayados a la concentración inicial de 12 mg/L

En la Figura V. 51 se representan las curvas de crecimiento de biomasa junto con los perfiles de oxígeno disuelto correspondientes. Se observa que existe un acoplamiento perfecto entre los resultados de los dos ensayos. Las curvas de crecimiento tienen forma de campana, con una fase de latencia, una etapa de crecimiento exponencial que alcanza su máximo justo cuando finaliza la etapa de degradación del tensioactivo, para continuar una disminución exponencial cuando no hay más sustrato disponible. Transcurrido un tiempo que oscila entre 54 y 167 horas, dependiendo del tensioactivo, se observa un repunte del crecimiento. Estos resultados demuestran que el sustrato, que es la única fuente de carbono disponible, soporta el crecimiento de los microorganismos y que cuando no hay más sustrato se produce una disminución de la población inicial. Finalizada esta etapa, son los metabolitos los que pasan a soportar el crecimiento de los microorganismos requiriendo para ello un nuevo periodo de adaptación. Estos resultados ponen de manifiesto que las curvas de degradación obtenidas por el método de la botella cerrada corresponden a una ruptura parcial de la molécula (biodegradación primaria) y no a su mineralización total.

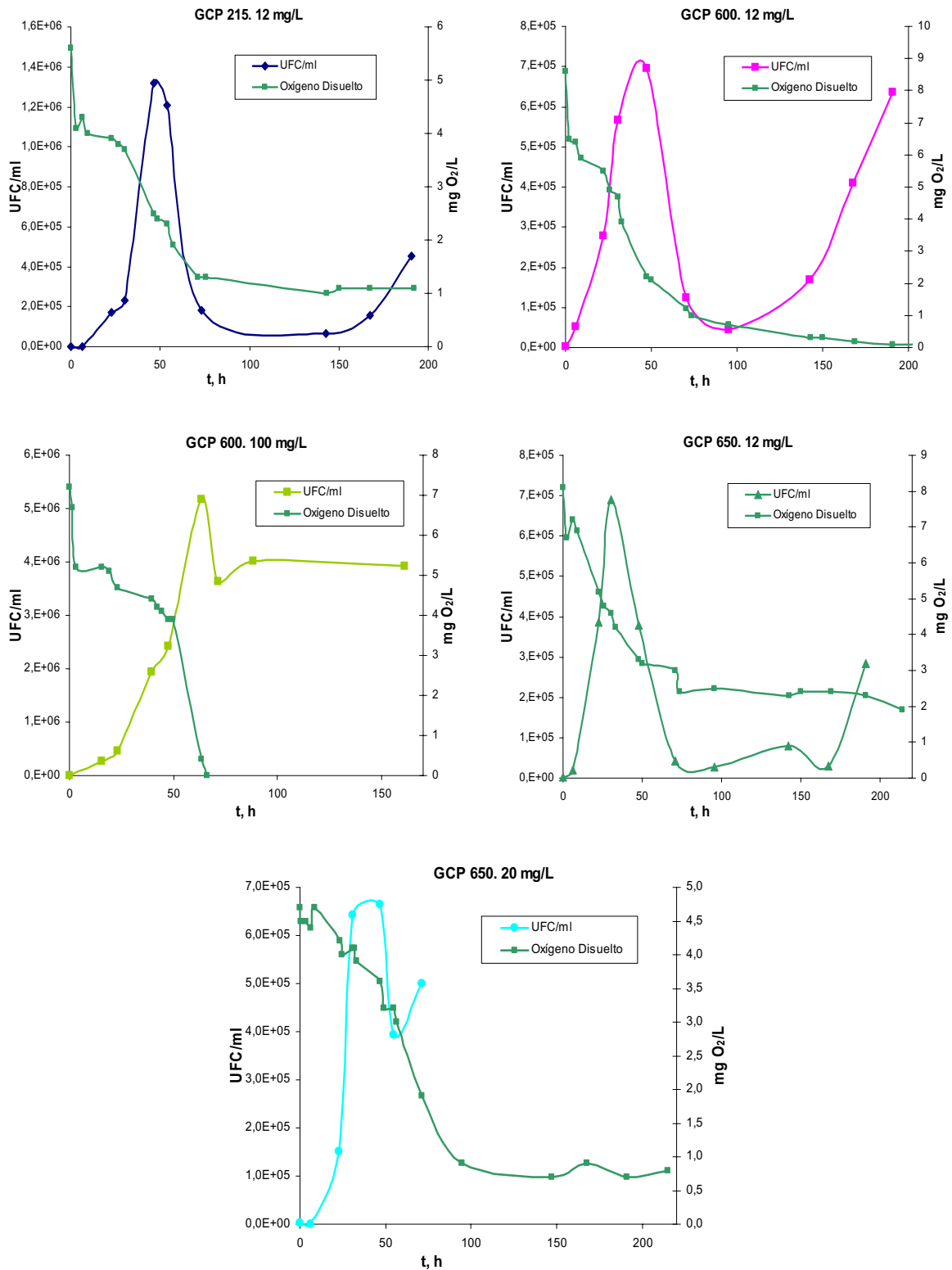


Figura V. 51.- Curvas de crecimiento de microorganismos y curvas de oxígeno disuelto para los APG ensayados a diferentes concentraciones iniciales

En la Tabla V. 35 se muestran los parámetros característicos de las curvas de crecimiento de microorganismos durante el proceso de biodegradación. UFC/ml_{max} representa el valor máximo de UFC/ml que aparecen en la primera fase de crecimiento exponencial.

También se ha determinado la velocidad específica de crecimiento (k), el rendimiento (Y_{ap}) y la concentración inicial de microorganismos (X_0) para los APG ensayados (Tabla V. 35). Se observa que el mayor valor de UFC/ml_{max} corresponde al tensioactivo con menor longitud de cadena carbonada GCP 215, y la menor velocidad específica de crecimiento es la obtenida para el tensioactivo GCP 600.

La relación entre la cantidad de microorganismos producidos y la cantidad de sustrato consumido viene dado por la ecuación de Gaden (Ecuación V. 39). Para obtener el valor de Y_{ap} se ha representado el valor de X (UFC/ml) frente a los valores de (S_0-S) , donde S_0 es la concentración de oxígeno inicial y S la concentración de oxígeno en cada instante. Si se cumple la hipótesis de Gaden, los datos deben ajustarse a una línea recta de pendiente Y_{ap} . En la Figura V. 52 se presentan estos resultados para los APG ensayados observándose que los puntos se alinean en una línea recta. El valor de Y_{ap} se muestra en la Tabla V. 35.

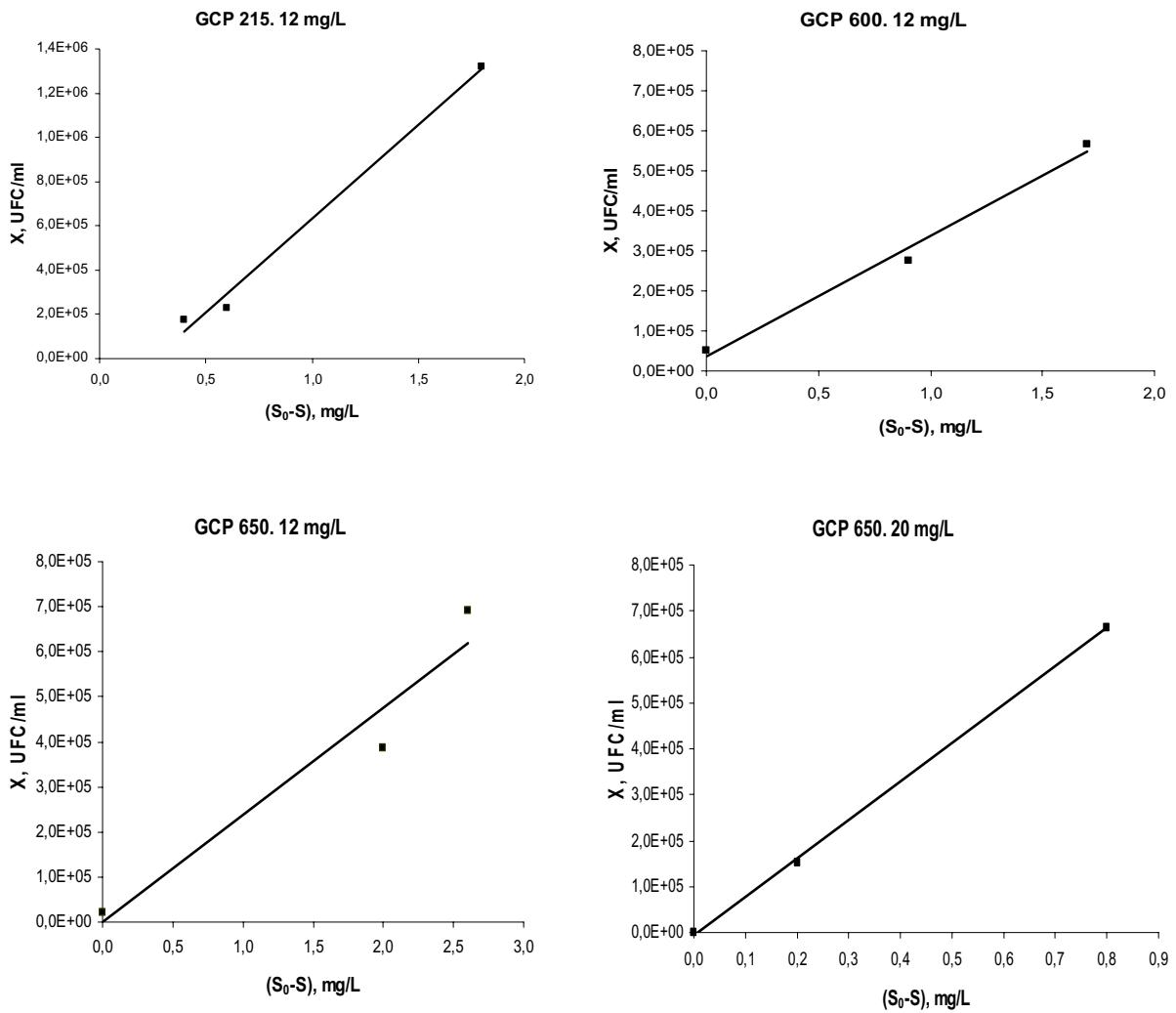
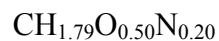


Figura V. 52.- Comprobación de la hipótesis de Gaden para los APG

También se ha calculado la concentración de microorganismos (biomasa) en mg/L, asumiendo la fórmula empírica celular generalmente propuesta para los microorganismos (Roels, 1983):



y el % de carbono fijado en forma de biomasa a partir de la expresión:

$$C(\%) = \frac{C_{biomasa}}{C_{tensioactivo}} * 100$$

Ecuación V. 84

Tabla V. 35.- Parámetros característicos de las curvas de crecimiento para los APG

GCP 215						
S ₀ , mg/L	X ₀ , UFC/ml	UFC/ml max	k, h ⁻¹	Y _{ap} , UFC/g sustrato	[biomasa], mg/L	%C fijado en forma de biomasa
12	1.37·10 ³	1.32·10 ⁶	0.161	8.50·10 ⁵	5.38·10 ⁻¹¹	1.25·10 ⁻¹¹
GCP 600						
S ₀ , mg/L	X ₀ , UFC/ml	UFC/ml max	k, h ⁻¹	Y _{ap} , UFC/g sustrato	[biomasa], mg/L	%C fijado en forma de biomasa
12	1.51·10 ³	6.95·10 ⁵	0.114	3.01·10 ⁵	2.83·10 ⁻¹¹	7.21·10 ⁻¹²
100	2.45·10 ³	5.18·10 ⁶	0.108	1.82·10 ⁶	2.11·10 ⁻¹⁰	6.46·10 ⁻¹²
GCP 650						
S ₀ , mg/L	X ₀ , UFC/ml	UFC/ml max	k, h ⁻¹	Y _{ap} , UFC/g sustrato	[biomasa], mg/L	%C fijado en forma de biomasa
12	3.17·10 ³	6.90·10 ⁵	0.175	2.39·10 ⁵	2.81·10 ⁻¹¹	8.05·10 ⁻¹²
20	1.75·10 ³	6.65·10 ⁵	0.156	8.36·10 ⁵	2.71·10 ⁻¹¹	4.67·10 ⁻¹²

La pequeña cantidad de biomasa formada, del orden de 10⁻¹¹ de la concentración inicial de C en el tensioactivo, evidencia una ruptura parcial de la molécula y permite confirmar que estamos observando en las curvas de biodegradación la biodegradación primaria del tensioactivo.

5.5.3. BIODEGRADACIÓN DE APG POR EL MÉTODO MANOMÉTRICO RESPIROMÉTRICO

La biodegradación última de los APG se ha medido utilizando el método respirométrico, que mide la demanda biológica de oxígeno (DBO) del compuesto en función del tiempo. Este método se ha aplicado para estudiar el efecto de la concentración de estos tensioactivos sobre el proceso de biodegradación última.

En la Figura V. 53 se representan las curvas de DBO para los APG ensayados a concentraciones iniciales de sustrato comprendidas entre 15 y 100 mg/L. Las curvas de degradación obtenidas presentan una forma sigmoideal lo que evidencia un mecanismo de eliminación biológica de los APG.

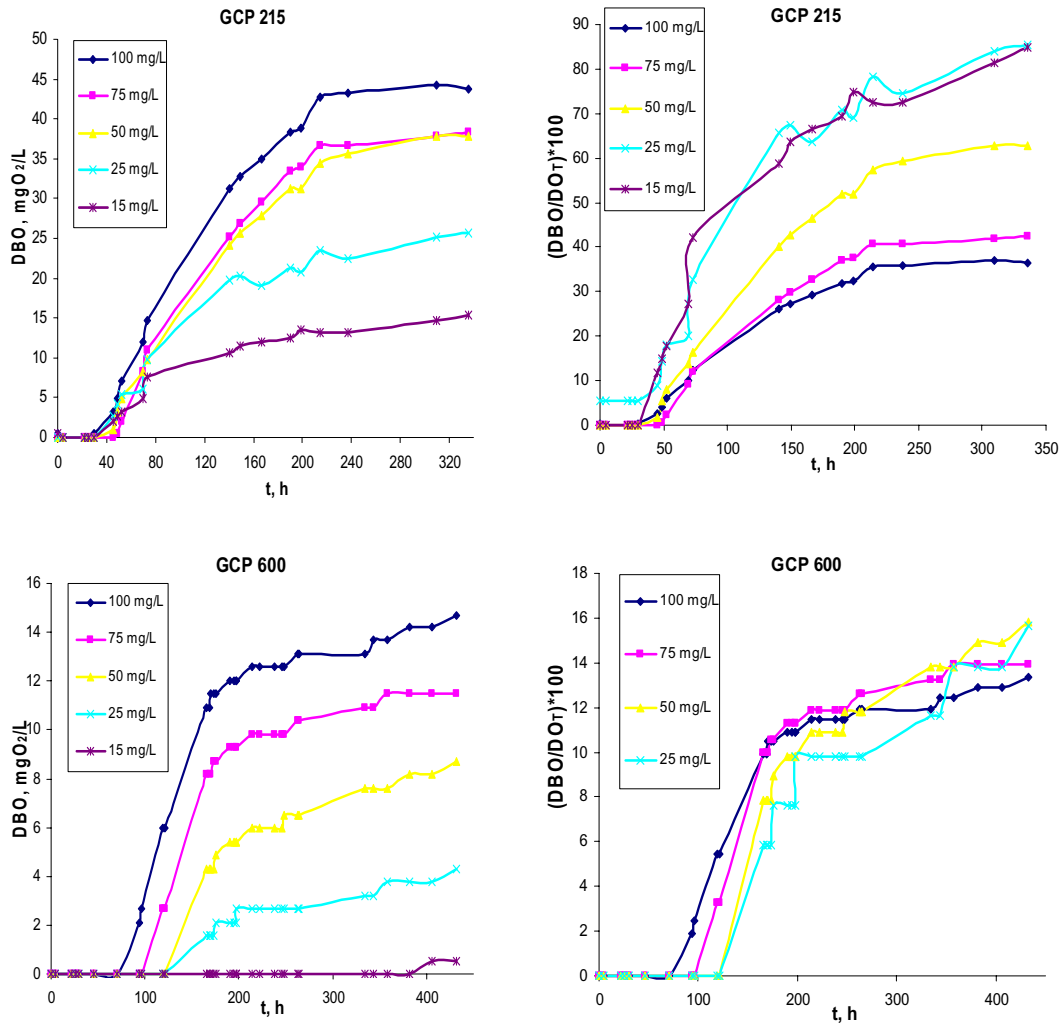


Figura V. 53.- Curvas de DBO y biodegradabilidad última por el método respirométrico para el GCP 215 y el GCP 650

Los resultados de la Figura V. 53 se expresan como DBO y como porcentaje de la demanda teórica de oxígeno ((DBO/DO_T)*100).

En la Figura V. 54 se comparan las curvas respirométricas obtenidas a la concentración inicial de 50 mg/L para los tres APG ensayados.

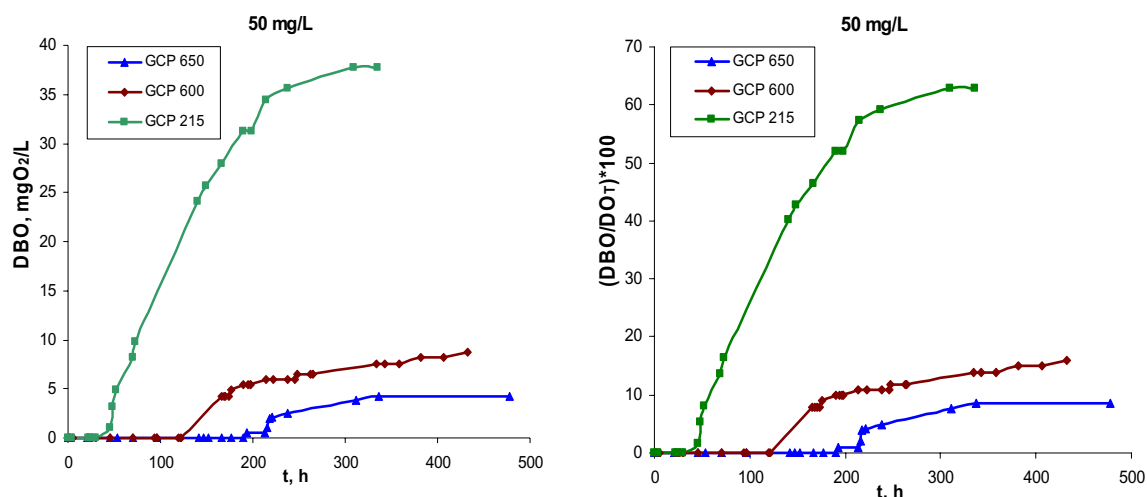


Figura V. 54.- Curvas de DBO y biodegradabilidad última por el método respirométrico para diferentes APG a 50 mg/L

La Tabla V. 36 recoge la equivalencia entre las distintas formas de expresar la concentración de tensioactivo: en mg/L, como demanda teórica de oxígeno (mg DO_T/L) y en mg C/L. También se incluye la concentración de tensioactivo (S_{real}) sin tener en cuenta la humedad del mismo (Tabla III. 1. de Materiales y Métodos).

Tabla V. 36.- Equivalencia entre la concentración de los APG en mg/L y su concentración expresada como demanda teórica de oxígeno y en mg C/L para el ensayo respirométrico

S ₀ , mg/L	GCP 215			GCP 600			GCP 650		
	S _{real} , mg/L	mg DO _T /L	mg C/L	S _{real} , mg/L	mg DO _T /L	mg C/L	S _{real} , mg/L	mg DO _T /L	mg C/L
15	9.45	18.03	5.33	8.01	--	--	--	--	--
25	15.75	30.05	8.89	13.35	27.47	8.16	--	--	--
50	31.50	60.11	17.79	26.70	54.95	16.33	24.80	50.39	14.54
75	47.25	90.16	26.68	40.05	82.43	24.5	--	--	--
100	63.00	120.22	35.58	53.40	109.91	32.67	--	--	--

Se observa que en el proceso de biodegradación del GCP 215 tiene una gran influencia la concentración de tensioactivo ensayada disminuyendo la biodegradación a medida que aumenta la concentración de tensioactivo, en cambio al tensioactivo GCP 600

no le afecta de forma significativa la concentración ensayada durante el proceso de biodegradación.

La comparación de los tres tensioactivos a la misma concentración (Figura V. 54) muestra de forma clara que el tensioactivo GCP 215 de menor cadena carbonada, mayor contenido de moléculas de glucosa y mayor HLB (Tabla III. 1.) es el más biodegradable, y el menos biodegradable el GCP 650 de mayor peso molecular medio que los anteriores.

Estimación de los parámetros de los perfiles de biodegradación

En todas las curvas de degradación obtenidas existe una fase de latencia o aclimatación, una fase de degradación (de incremento exponencial) y una zona de mineralización. (Figura V. 55).

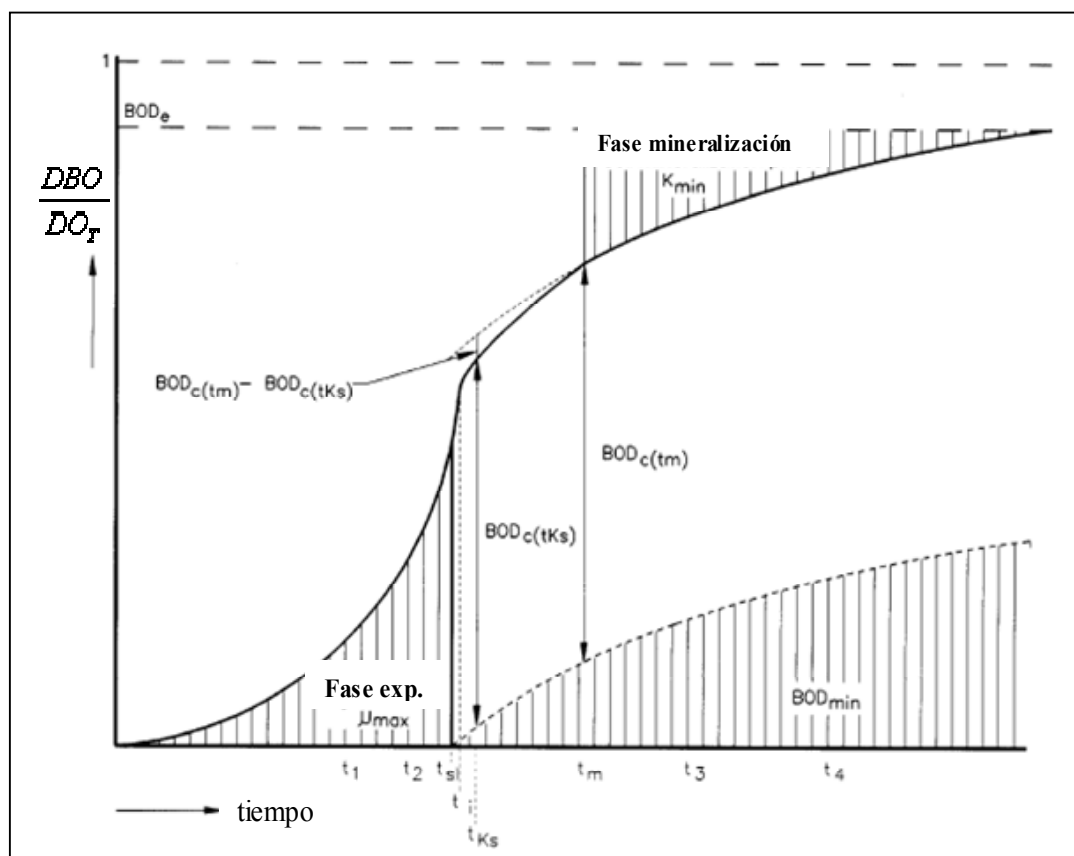


Figura V. 55.- Curva típica de consumo de oxígeno. Determinación de los parámetros cinéticos de acuerdo con Blok y col. (Blok, 1996)

De acuerdo con Blok y col. (Blok, 1996) los parámetros cinéticos de crecimiento se pueden calcular a partir de los perfiles respirométricos tal como se describe a continuación. Se ha utilizado a título de ejemplo el perfil del GCP 215 a 50 mg/L (Figura V. 53).

Los valores de la tasa específica de crecimiento de los microorganismos (μ) se obtienen de la parte exponencial del perfil respirométrico de acuerdo con:

$$\mu = \frac{\ln(DBO_{t_2} / DBO_{t_1})}{t_2 - t_1}$$

Ecuación V. 85

donde t_1 y t_2 son dos puntos cualquiera de la fase exponencial, y DBO_{t_1} y DBO_{t_2} sus valores correspondientes.

La constante de mineralización de primer orden (K_{min}) se calcula utilizando la última parte de la curva, a partir de la pendiente de la siguiente representación:

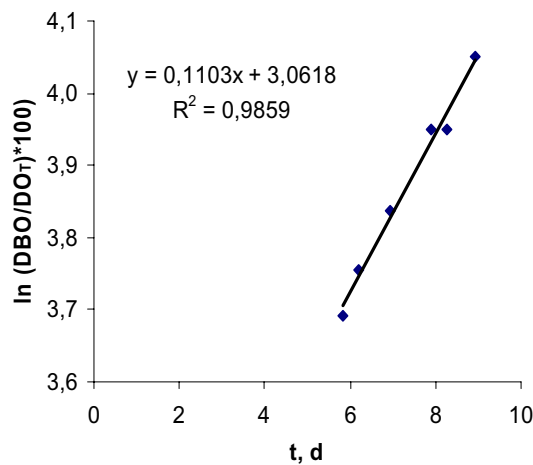


Figura V. 56.- Representación de ln DBO frente al tiempo para la obtención de K_{min}

Para estimar la constante de saturación (K_S) es necesario separar la etapa de mineralización de la etapa de degradación (Figura V. 55). Para su cálculo se utiliza la siguiente expresión:

$$K_S = \frac{DBO_c(t_m) - DBO_c(t_{K_S})}{DBO_c(t_m)} S_0$$

Ecuación V. 86

donde:

- DBO_c es la DBO corregida por la fase de mineralización de acuerdo con la expresión: $DBO_c = DBO_{total} - DBO_{min}$.

DBO_{min} corresponde a la demanda de oxígeno de mineralización. En la siguiente figura se muestran los resultados para el Glucopón 215 a 50 mg/L:

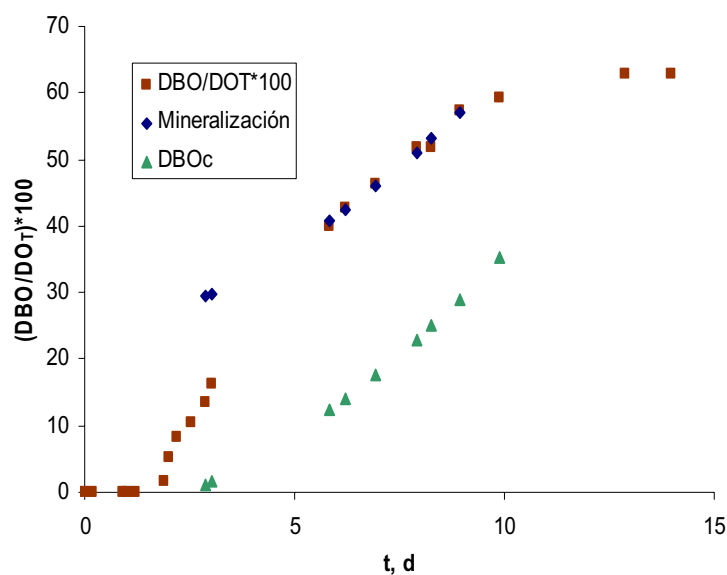


Figura V. 57.- Representación de DBO frente al tiempo para la obtención de K_S

- t_m : es el tiempo a partir del cual la velocidad de mineralización es de primer orden (Figura V. 58).

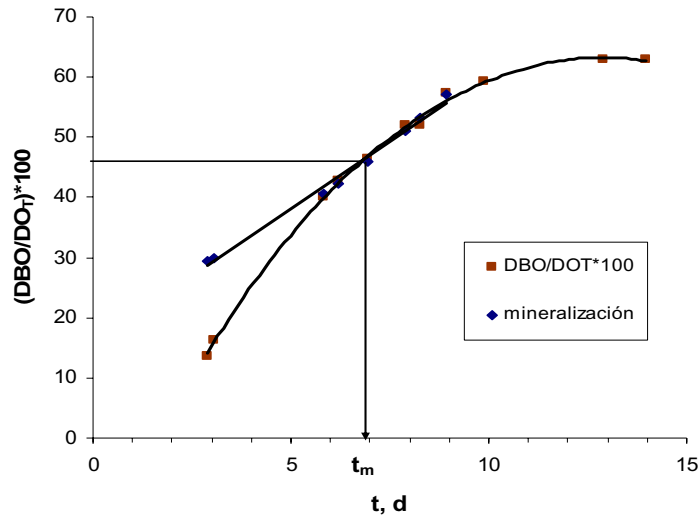


Figura V. 58.- Obtención de t_m a partir de la curva de mineralización

- t_{KS} : es el tiempo donde la concentración de sustrato residual es K_S . Se cumple que:

$$a_{t_{KS}} \frac{dDBO_c / dt}{DBO_c(t_{KS})} = \frac{1}{2} \frac{(dDBO_c / dt)_{t_i}}{DBO_c(t_i)}$$

Ecuación V. 87

expresión que se utiliza para el cálculo de t_{KS} utilizando la herramienta *Solver* de la hoja de cálculo *Excel*.

Para estimar t_{KS} es necesario calcular la DBO corregida y su derivada en un tiempo t_i , que es el punto de inflexión de la curva de crecimiento exponencial debido a la limitación de sustrato. Para su determinación se ha tenido en cuenta la fase logarítmica. Se ha buscado ajustando la curva a un polinomio de tercer grado y localizando el mínimo de la derivada de ese polinomio (Figura V. 59).

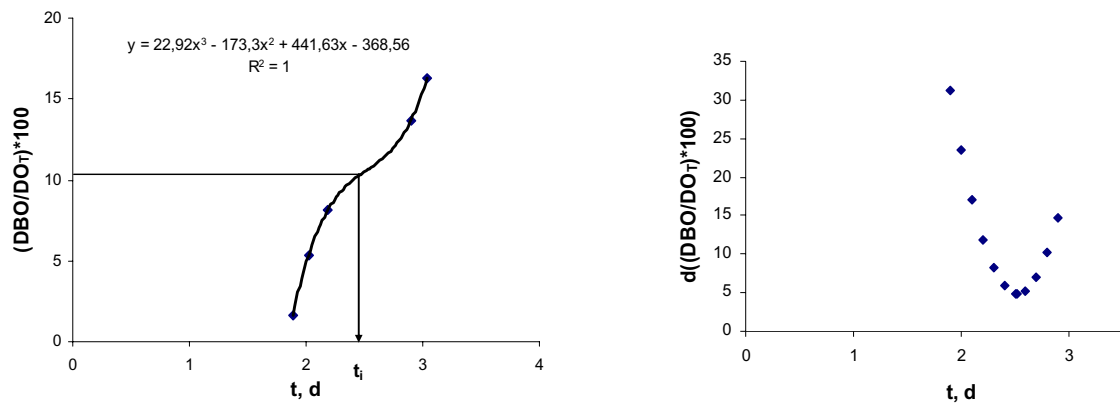


Figura V. 59.- Localización del punto de inflexión para la obtención de K_S

En la Tabla V. 37 se muestran los valores de μ y K_{min} obtenidos para los APG ensayados y a todas las concentraciones estudiadas. También se muestran los valores del tiempo de latencia (t_L), el porcentaje de biodegradación última alcanzado (Min) y el valor de K_S para los perfiles en los que se ha podido obtener.

En la Figura V. 60 se ha representado como varía μ frente a la concentración de sustrato para los tensioactivos GCP 215 y GCP 600. Los resultados indican la existencia de inhibición del crecimiento por sustrato.

Tabla V. 37.- Parámetros cinéticos característicos del proceso de biodegradación para los APG por el método respirométrico

S_0 , mg/L	GCP 215				
	t_L , d	Min, %	μ , d^{-1}	K_{min} , d^{-1}	K_S , mg/L
15	0.89	84.84	6.11	0.055	6.25
25	0.89	85.52	7.78	0.040	14.95
50	0.89	62.88	6.23	0.110	26.80
75	1.04	42.48	3.44	0.120	64.81
100	0.89	36.43	3.62	0.095	50.62
S_0 , mg/L	GCP 600				
	t_L , d	Min, %	μ , d^{-1}	K_{min} , d^{-1}	K_S , mg/L
25	6.3	15.65	1.40	0.048	--
50	5.1	15.83	1.11	0.049	--
75	4.0	13.95	1.02	0.025	6.35
100	2.1	13.37	0.77	0.020	2.65
S_0 , mg/L	GCP 650				
	t_L , d	Min, %	μ , d^{-1}	K_{min} , d^{-1}	K_S , mg/L
50	8	8.53	1.00	--	--

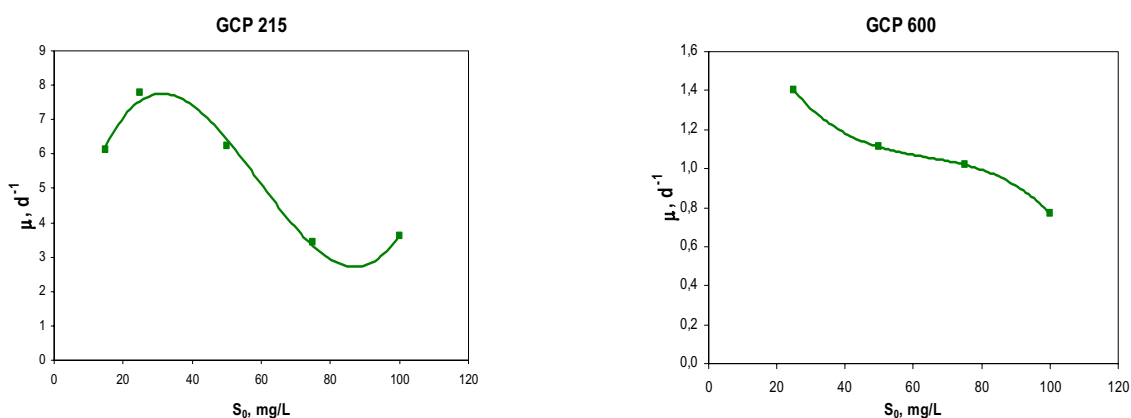


Figura V. 60.- Representación de μ frente a la concentración de sustrato para el GCP 215 y el GCP 600

Se observa que el tiempo de latencia o de adaptación de los microorganismos al tensioactivo es considerablemente mayor que los obtenidos en el caso de los alcoholes grasos etoxilados, esto debe estar motivado por la escasa utilización de estos tensioactivos actualmente en los productos comerciales, ya que el inóculo utilizado proviene del tratamiento de aguas residuales urbanas. El tiempo de latencia menor es el obtenido para el

GCP 215, y no hay influencia de la concentración del tensioactivo ensayado así como el mayor porcentaje de mineralización. Para el GCP 600 se observa una disminución del t_L al aumentar la concentración de tensioactivo. El tensioactivo que necesita un mayor tiempo para su adaptación a los microorganismos y presenta el menor porcentaje de mineralización es el GCP 650.

De acuerdo con la OCDE una sustancia se considera fácilmente biodegradable si el tanto por ciento de mineralización alcanzado es al menos del 60% en un plazo de 28 días cuando se somete al ensayo respirométrico. Los resultados obtenidos indican que este requisito en las condiciones ensayadas sólo lo cumple el GCP 215 y a concentraciones inferiores ó iguales a 25 mg/L. De acuerdo con este criterio los otros dos tensioactivos no serían fácilmente biodegradables a concentraciones mayores de 25 mg/L, no obstante las concentraciones reales existentes de estos tensioactivos en el medio ambiente son siempre menores de 5 mg/L.

De acuerdo con Blok y col. los valores de μ obtenidos por el método respirométrico, y que no dependen del tiempo total en el que se ha realizado el ensayo, también permiten clasificar los tensioactivos como recalcitrantes ($\mu < 0.1 \text{ d}^{-1}$), con biodegradabilidad inherente ($0.1 < \mu < 1.5 \text{ d}^{-1}$) y fácilmente biodegradables para ($\mu > 1.5 \text{ d}^{-1}$) (Blok, 1996).

Según esta clasificación el tensioactivo de menor cadena carbonada y mayor grado de polimerización de los ensayados, GCP 215, se podría clasificar como fácilmente biodegradable, ya que μ tiene un valor comprendido entre 3.62 y 6.11 d^{-1} , los tensioactivos GCP 600 y GCP 650 se podrían clasificar como tensioactivos con biodegradabilidad inherente.

No obstante, numerosos estudios existentes revelan que los APG en comparación con otros tensioactivos son “fácilmente biodegradables”, por lo que se degradarán de forma rápida y extensa cuando se descarguen en entornos ambientales (Steber, 1995; Madsen, 1996; García, 1997). Además en experimentos en los que se somete a los mismos ensayos de biodegradabilidad al LAS y a los APG, estos resultan con un potencial de biodegradación significativamente mayor (Eichhorn, 1999).

Biodegradación del tensioactivo FINDET 1618A/18 por el método respirométrico

Para comparar la biodegradabilidad de los tensioactivos AGE y los APG en las mismas condiciones también se ha realizado un ensayo mediante respirometría manométrica para el tensioactivo Findet 1618A/18. Los resultados obtenidos (perfiles respirométricos, y parámetros cinéticos) para este tensioactivo pueden observarse en la Figura V. 61 y en la Tabla V. 38 respectivamente.

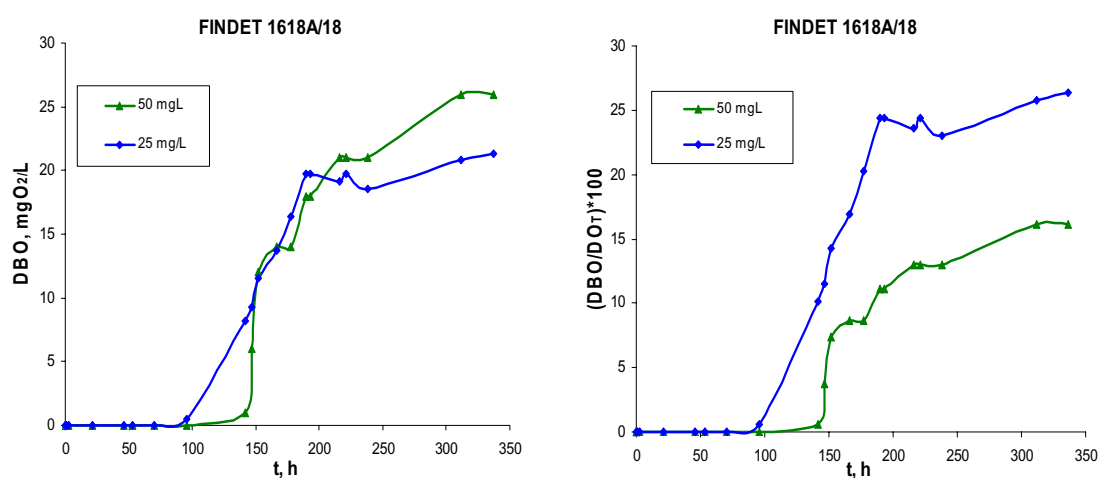


Figura V. 61.- Curvas de DBO y biodegradabilidad última por el método respirométrico para el Findet 1618A/18

Tabla V. 38.- Parámetros cinéticos característicos del proceso de biodegradación para el Findet 1618A/18 por el método respirométrico

S_0 , mg/L	FINDET 1618A/18				
	t_L , d	Min, %	μ , d^{-1}	K_{min} , d^{-1}	K_S , mg/L
25	2.9	33.30	1.31	0.397	12.94
50	4.0	20.30	4.84	0.171	5.80

Se observa que los valores de μ obtenidos por el método respirométrico son superiores a los valores de μ_m obtenidos aplicando el modelo propuesto para los resultados obtenidos de los ensayos de biodegradación por el ensayo estático, por lo tanto no son valores comparables.

5.6. BIODEGRADACIÓN DEL LAS

Los LAS son uno de los tensioactivos más estudiados en los últimos años, sobre todo en aspectos relacionados con su biodegradabilidad primaria y total. Alguno de los motivos por los que los LAS han alcanzado tanta importancia son, entre otros: la preocupación acerca de que el anillo bencénico de la molécula pueda ser biorresistente y acumularse en el agua, y por lo tanto que el compuesto no sea totalmente biodegradable, y además el elevado volumen que este tensioactivo alcanza en el medio natural.

En la Tabla V. 39 se recogen los resultados obtenidos por diversos autores para ensayos de fácil biodegradabilidad en los que se emplean medios sintéticos con concentraciones de inóculo relativamente bajas (10^2 - 10^3 bacterias/ml). El porcentaje de biodegradación se ha calculado midiendo la concentración de tensioactivo residual como MBAS.

Tabla V. 39.- Algunos resultados de biodegradación de LAS en ensayos con medio sintético y bajas concentraciones de inóculo (Perales, 2001)

Compuesto	S ₀ (mg/L)	% Biodeg.	t, días	Referencia
LAS	5	100*	7	<i>Swisher</i> (1966)
JNQ sulfonato	15	90-97	10	<i>Painter</i> (1978)
JNQ sulfonato	20	75	8	<i>Brown</i> (1976)
Marlon A	20	99 93	28 7	<i>Brown</i> (1976)
LAS	5	100	21	<i>Sengul</i> (1980)
LAS	(2 - 5)	91 96	5 10	<i>Hrsak</i> (1981)
C ₁₂ -LAS	30	95	5	<i>Kravetz</i> (1982)
C ₁₃ -LAS	30	95	28	<i>Kravetz</i> (1982)
LAS	5.5	95	28	<i>Gerike</i> (1987)
LAS	32	99	4	<i>Boatman</i> (1986)

* sin adición de inóculo en un medio no esterilizado. Marlon A: mezcla comercial de homólogos de LAS.

Incluso en ausencia de inóculo, Swisher (Swisher, 1966) encontró que el 100% de MBAS fue eliminado en 7 días con una concentración inicial de LAS de 5 mg/L, solo con los microorganismos que puedan pasar al reactor provenientes de la atmósfera. Los grados de biodegradación más elevados (99% en 4 días) se deben probablemente a la preaclimatación del inóculo y a que la concentración de éste es mucho más elevada que para el resto de ensayos.

El LAS se ha empleado en esta investigación como patrón blando en todos los ensayos de biodegradación realizados por sus características de biodegradabilidad. Solo se han aceptado como válidos aquellos ensayos en los que la biodegradación del LAS ha sido mayor del 90% a los cinco días (apartado 3.3.1.6.), (UNE 55-844-91).

Para el estudio de la biodegradación primaria del LAS se modificó la concentración inicial del ensayo. Los valores de concentración estudiados fueron: 5 mg/L, 25 mg/L, 50 mg/L y 100 mg/L. El seguimiento de la biodegradación se realizó aplicando el método simplificado de análisis para determinación de tensioactivos aniónicos (MBAS) desarrollado en esta Tesis Doctoral (apartado 3.4.1.1.).

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura V. 62 donde, para su comparación, la concentración de tensioactivo se ha expresado como tanto por ciento de tensioactivo residual. Se observó que durante el periodo de aclimatación de los microorganismos existía un ligero aumento de la concentración de tensioactivo debido su acumulación en la interfase, fenómeno que intentó reducirse al mínimo agitando energicamente la disolución de tensioactivo antes de proceder a la toma de muestra.

A medida que se incrementa la concentración de tensioactivo se requiere un mayor tiempo para conseguir el mismo nivel de biodegradación; a concentraciones de tensioactivo bajas, hasta 25 mg/L, se produce una rápida biodegradación aproximadamente a los 2 días del ensayo; para concentraciones mayores, 50 mg/L, el proceso de biodegradación es más lento y se requiere un mayor tiempo de adaptación de los microorganismos al medio (8 días). En experimentos realizados a 100 mg/L, durante 9 días no se observó biodegradación alguna.

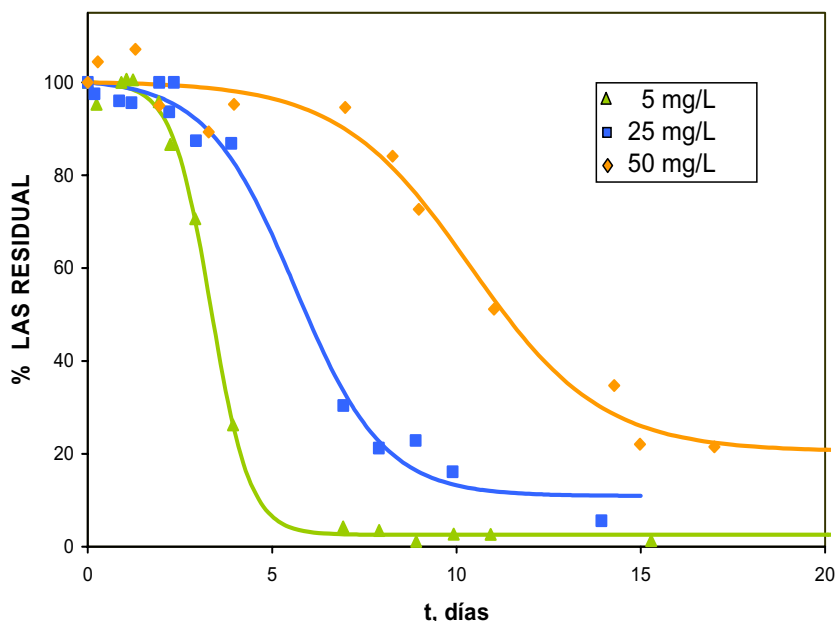


Figura V. 62.- Perfiles de biodegradación del LAS a 5, 25 y 50 mg/L

En la Tabla V. 40 se presentan los parámetros característicos de los perfiles de biodegradación. Para este tensioactivo se observa un mayor tiempo de adaptación de los microorganismos, lo que motiva que la biodegradabilidad alcanzada a las 50 horas sea mucho mas baja que para los tensioactivos no iónicos etoxilados. El $t_{1/2}$ y V_M determinan una disminución de la velocidad de biodegradación y la concentración de tensioactivo residual aumenta con la concentración del tensioactivo ensayada.

Tabla V. 40.- Parámetros característicos de los perfiles de biodegradación para el LAS

S_0 , mg/L	t_I , h	B, %	t_L , h	$t_{1/2}$, h	V_M , %/h	S_R , mg/L
5	366.75	18	38.50	78.23	0.710	0.098
25	334.50	5	96.23	142.74	0.342	1.426
50	408.00	17	182.61	251.44	0.214*	9.167

(*) calculada para un valor de biodegradación del 60%

Durante los ensayos de biodegradación también se estudió el crecimiento de microorganismos junto con los perfiles de biodegradación primaria. El número de microorganismos viables se obtuvo mediante recuento heterótrofo en placa (apartado 3.4.2.), expresándose el resultado como unidades formadoras de colonias por ml (UFC/ml). En la Tabla V. 41 se muestran los parámetros característicos de las curvas de crecimiento

para las concentraciones estudiadas, donde se aprecia la disminución de la velocidad de crecimiento (k) y una menor cantidad de unidades formadoras de colonias con la concentración de tensioactivo ensayada. El parámetro Y_{ap} se ha obtenido de acuerdo con el procedimiento descrito en el apartado 5.2.5.

Tabla V. 41.- Parámetros característicos de las curvas de crecimiento para el LAS

S_0 , mg/L	X_0 , UFC/ml	UFC/ml _{max}	k , h ⁻¹	Y_{ap} , UFC/g sustrato
5	$1.51 \cdot 10^3$	$3.00 \cdot 10^4$	0.031	$2.23 \cdot 10^4$
25	$1.60 \cdot 10^4$	$2.97 \cdot 10^6$	0.026	$1.38 \cdot 10^5$
50	72	$7.16 \cdot 10^5$	0.013	$8.39 \cdot 10^4$

La Figura V. 63 muestra las curvas de crecimiento de los microorganismos a las tres concentraciones estudiadas junto con sus perfiles de biodegradación correspondientes. Se observa que las curvas de crecimiento tienen forma de campana, con una fase de latencia, una etapa de crecimiento exponencial que alcanza su máximo justo cuando finaliza la etapa de degradación del tensioactivo, para continuar una disminución exponencial cuando no hay más sustrato disponible. Nuevamente se pone de manifiesto que el sustrato, que es la única fuente de carbono disponible, soporta el crecimiento de los microorganismos y que cuando no hay más sustrato se produce una disminución de la población inicial.

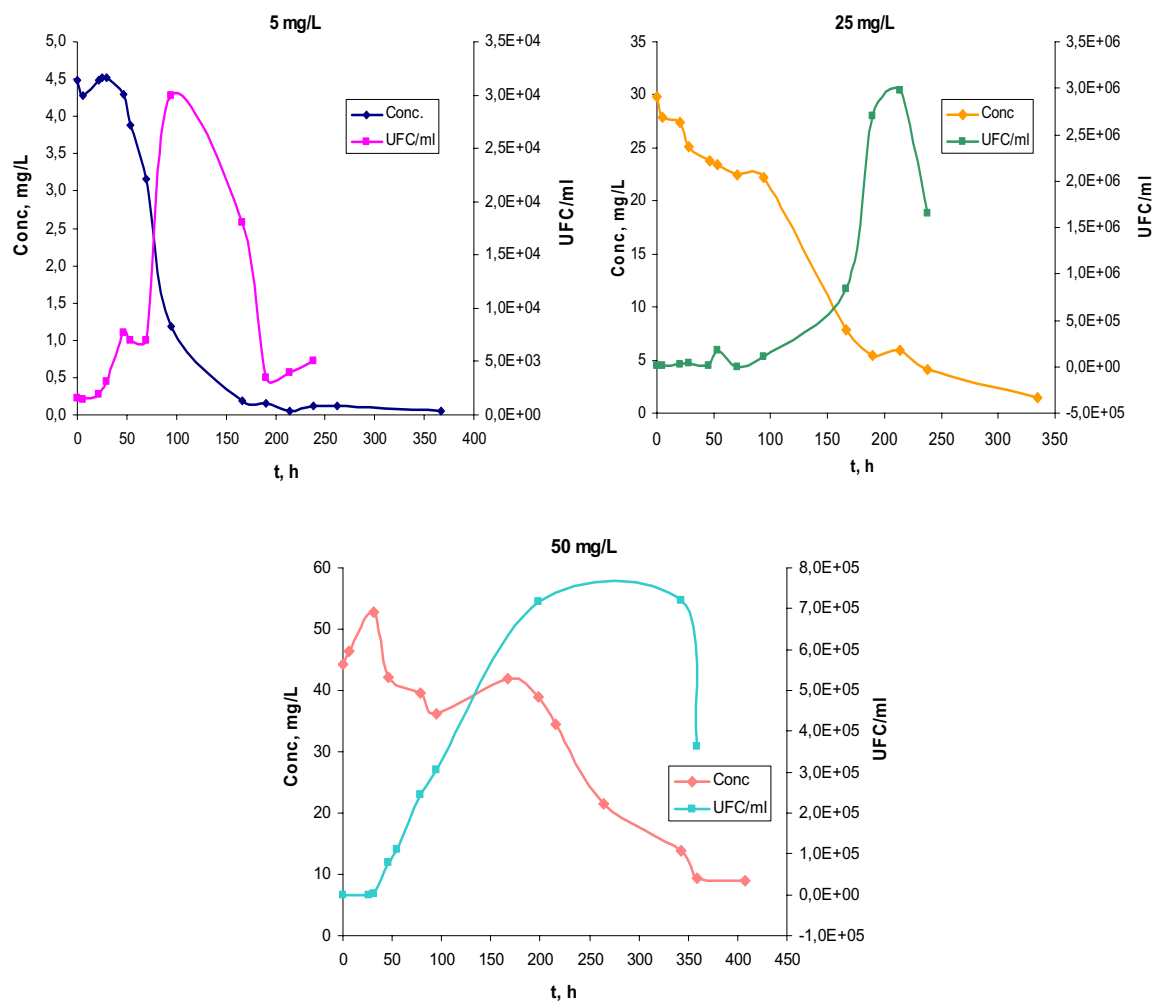


Figura V. 63.- Curvas de crecimiento de microorganismos y perfiles de biodegradación primaria para el LAS a diferentes concentraciones iniciales de ensayo

5.6.1. ESTUDIO CINÉTICO DE LA BIODEGRADACIÓN PRIMARIA DEL LAS

La cinética de la biodegradación primaria del LAS ha sido estudiada por diversos autores. Yakabe y col. (Yakabe, 1992) estudian en agua dulce, a una concentración inicial de 2.44 mg/L y en presencia de bacterias aclimatadas, la biodegradación del LAS, obtienen que la concentración de tensioactivo residual disminuye de acuerdo con una cinética de orden cero.

En agua de mar y a una concentración inicial de 4 mg/L Quiroga y col. (Quiroga, 1991) proponen un modelo representado por una ecuación polinomial de segundo orden

que ajusta bien los datos experimentales y justifica el periodo de adaptación de los microorganismos al medio estimando la concentración de tensioactivo residual.

En aguas residuales, estudios de biodegradación realizados por Moreno y col. (Moreno, 1990) y Berna y col. (Berna, 1989), determinan que la concentración de tensioactivo residual disminuye de acuerdo con una cinética de orden uno.

En la Tabla V. 42. se muestran algunos parámetros cinéticos estimados para el LAS en diferentes condiciones experimentales.

Tabla V. 42.- Parámetros cinéticos para el LAS

Compuesto	S ₀ (mg/L)	Ensayo	Condiciones	Modelo	Parámetros	Referencia
LAS	20	“River die-away”	20 °C Agua de mar Bacterias no aclimatadas	Logístico	B ₀ = 0.421 mg/L K = 0.016 mg.L ⁻¹ .d ⁻¹	Perales (2001)
LAS	10	“River die-away”	20 °C Agua de mar Bacterias aclimatadas	Primer Orden	k = 0.628 d ⁻¹	Perales (2001)

En principio se puede concluir que dependiendo de las condiciones del ensayo, la concentración inicial de tensioactivo, la adaptación de las bacterias utilizadas etc. los modelos utilizados y los parámetros cinéticos obtenidos pueden ser muy diferentes.

En el estudio de la influencia de la concentración sobre la cinética de biodegradación del LAS se han aplicado diferentes modelos cinéticos: de orden cero, de primer orden, el modelo de Quiroga y col., el modelo logístico y modelo cinético para sustratos que soportan el crecimiento de microorganismos, modelo de Monod considerando una concentración de tensioactivo residual. A continuación se muestran los resultados obtenidos de la aplicación de estos modelos cinéticos a las cinéticas de biodegradación primaria del LAS.

A valores bajos de concentración (5 mg/L) la cinética de biodegradación primaria del LAS es de orden cero (Ecuación V. 88), con un valor de $k_0=1.54$ mg/L·d.

$$\frac{S}{S_0} = 1 - \frac{k_0}{S_0} \cdot t$$

Ecuación V. 88

A concentraciones mayores de tensioactivo (25 y 50 mg/L), la cinética de biodegradación se ajusta a un modelo de orden uno (Ecuación V. 89) y la concentración de tensioactivo puede seguirse mediante la expresión:

$$\frac{S}{S_0} = \exp(-k_1 \cdot t)$$

Ecuación V. 89

con un valor de k_1 de 0.25 d^{-1} (a 25 mg/L) y de 0.17 d^{-1} (a 50 mg/L).

Las constantes cinéticas k_0 y k_1 se han obtenido mediante regresión no lineal del ajuste de la Ecuación V. 88 y la Ecuación V. 89 a los perfiles de biodegradación (Figura V. 62), una vez finalizada la fase de aclimatación de los microorganismos. La comparación de resultados experimentales y calculados con la Ecuación V. 88 y Ecuación V. 89 se muestran en la Figura V. 64, donde se han simulado mediante líneas de trazo discontinuo.

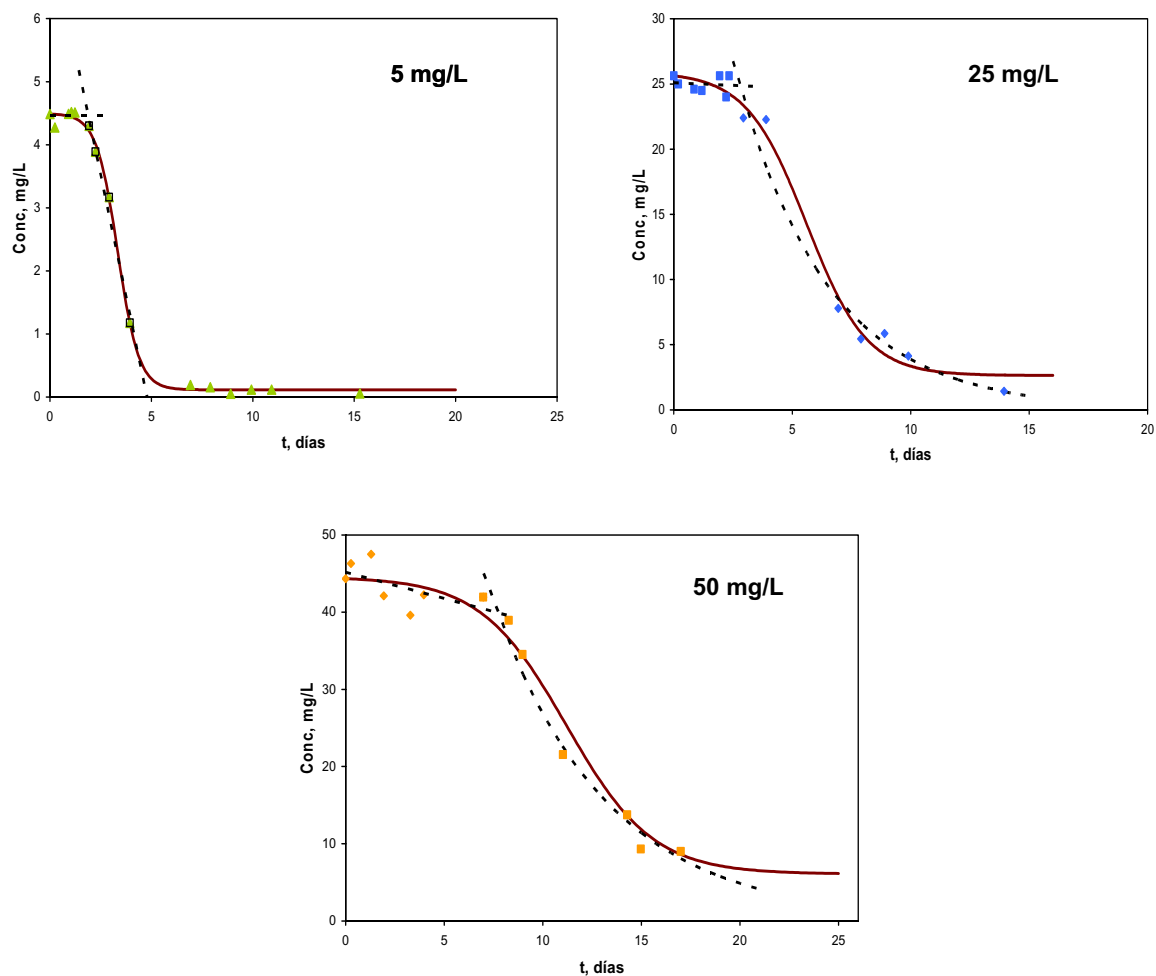


Figura V. 64.- Comparación entre los resultados experimentales y los calculados por diferentes modelos para el LAS a las concentraciones de 5, 25 y 50 mg/L respectivamente

La disminución de la constante de velocidad de orden uno pone de manifiesto una ralentización del proceso de biodegradación con el aumento de la concentración. Asimismo, concentraciones superiores a 100 mg/L producen un efecto inhibitor de los microorganismos del ensayo.

Sin embargo, para predecir el comportamiento cinético en todo el intervalo de tiempo ensayado, la forma sigmoideal de los perfiles de biodegradación obtenidos sugiere el uso de modelos basados en el crecimiento de los microorganismos para justificar la dependencia experimental observada. Quiroga y col. (Quiroga, 1991) han propuesto un modelo cinético para la degradación de tensioactivos representado por una ecuación polinómica de 2º grado del tipo:

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

Ecuación V. 90

La integración de la ecuación anterior proporciona la siguiente relación para la dependencia del tensioactivo con el tiempo:

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

Ecuación V. 91

donde p representa la velocidad máxima de crecimiento de los microorganismos; q la concentración de sustrato no biodegradable; h la máxima concentración de sustrato invertible en formación de biomasa; K₁, K₂, y K₀ los coeficientes del polinomio de segundo grado; S₀ la concentración inicial de tensioactivo; y t el tiempo (apartado 2.4.3.5.).

En la Figura V. 64 también se muestran los ajustes del modelo propuesto por Quiroga y col. para todas las concentraciones de tensioactivo ensayadas (línea de trazo continuo), y en la Tabla V. 43 se resumen los parámetros cinéticos del modelo.

Tabla V. 43.- Parámetros del modelo de Quiroga y col. para el LAS a diferentes concentraciones

S ₀ , mg/L	h, mg/L	q, mg/L	p, h ⁻¹	r
5	4.495	0.115	0.079	0.999
25	25.907	2.634	0.032	0.992
50	44.563	6.085	0.019	0.963

Como se aprecia en la Figura V. 64, el modelo justifica bien la dependencia experimental observada para todos los puntos experimentales, incluyendo el periodo de adaptación de los microorganismos. Los parámetros evaluados también justifican este modelo ya que el parámetro q (concentración de sustrato no biodegradable) aumenta con la concentración inicial de tensioactivo, y p (velocidad máxima de crecimiento de los microorganismos) es inversamente proporcional a dicha concentración.

Si se tiene en cuenta la Ecuación V. 52, Ecuación V. 53 y Ecuación V. 54 que expresan la relación entre los parámetros del modelo de Quiroga y col. y las constantes cinéticas del modelo propuesto en esta investigación (Ecuación V. 58), se puede determinar la relación entre la velocidad máxima de crecimiento y la constante K_S (μ_m/K_S) a las diferentes concentraciones ensayadas. Se observa que esta relación, que debe ser constante, disminuye con la concentración de sustrato. Los valores obtenidos de (μ_m/K_S) son: $1.58 \cdot 10^{-2}$, $1.35 \cdot 10^{-3}$ y $4.6 \cdot 10^{-4}$ para las concentraciones de 5, 25 y 50 mg/L respectivamente.

También se ha aplicado el modelo logístico propuesto por (Simkins, 1984) según la ecuación:

$$S = \frac{(S_0 + B_0)}{1 + \left(\frac{B_0}{S_0}\right) \cdot e^{[K \cdot (S_0 + B_0) t]}}$$

Ecuación V. 92

Se trata de un modelo con un menor número de parámetros: B_0 y K , donde B_0 es la cantidad de sustrato requerido para producir una densidad celular X_0 y K , si tenemos en cuenta la ecuación del modelo cinético desarrollado en el apartado 2.4.3.2., viene expresada por la relación:

$$K = \frac{\mu_{\max}}{K_S}$$

En la Tabla V. 44 se presentan los parámetros cinéticos del modelo logístico a diferentes concentraciones iniciales. Se observa como el valor de K disminuye al aumentar la concentración inicial del ensayo. En la Figura V. 65 se comparan los valores experimentales y los calculados con el modelo logístico.

Tabla V. 44.- Parámetros cinéticos del modelo logístico para el LAS a diferentes concentraciones iniciales

LAS			
S ₀ , mg/L	B ₀ , (mg /L)	K (mg/L· h)	r
5	0,008	0,017	0,998
25	3,251	6.00·10 ⁻⁴	0,992
50	0,719	3.00·10 ⁻⁴	0,962

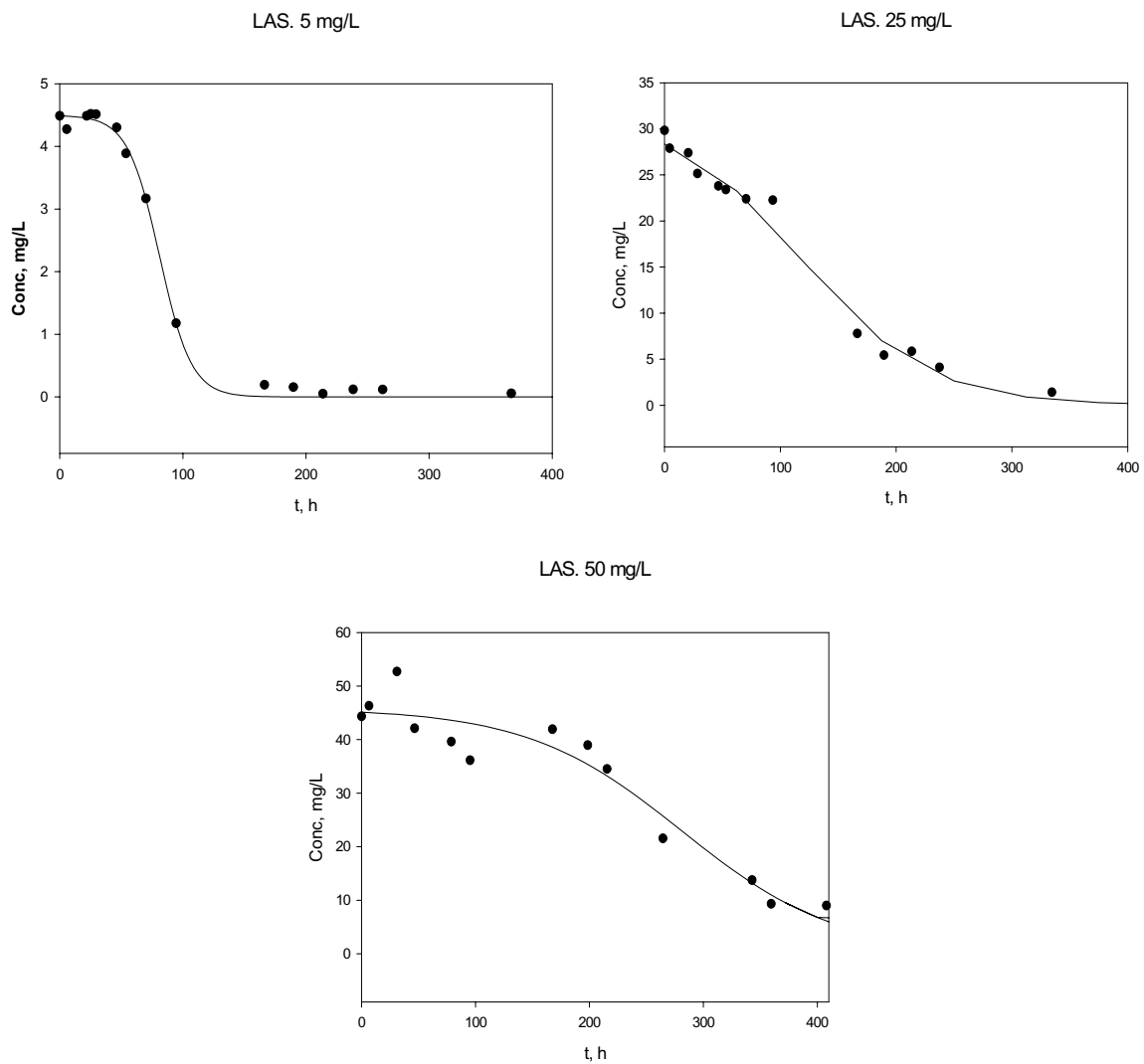


Figura V. 65.- Comparación entre los resultados experimentales y los obtenidos aplicando el modelo logístico para el LAS a diferentes concentraciones iniciales

Para el LAS también se ha aplicado el modelo cinético para sustratos que soportan el crecimiento de microorganismos considerando una concentración de tensioactivo residual, modelo de Monod (Ecuación V. 58), para lo cual se han calculado las conversiones según la Ecuación V. 25. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla V. 45 donde se muestra también el valor de K_S teniendo en cuenta la relación:

$$\beta_s = \frac{K_S}{S_0}$$

Para comprobar que se cumple la hipótesis de Gaden se ha representado el valor de X (UFC/ml) frente a los valores de (S_0-S) , donde S_0 es la concentración de sustrato inicial y S la concentración de sustrato en cada instante. Esta representación se muestra a título de ejemplo para el ensayo a 50 mg/L (Figura V. 66) observándose que los puntos se alinean en una línea recta. Los valores de Y_{ap} se muestran en la Tabla V. 41.

Tabla V. 45.- Parámetros cinéticos del modelo propuesto para el LAS a diferentes concentraciones iniciales

LAS						
S_0 , mg/L	α_0	β_s	μ_m , h ⁻¹	K_S , mg/L	x_m	r
5	$1.70 \cdot 10^{-3}$	0.746	0.060	3.73	0.974	0.999
25	$1.92 \cdot 10^{-3}$	0.462	0.053	11.55	0.981	0.999
50	$9.00 \cdot 10^{-4}$	0.145	0.049	7.26	0.799	0.966
Parámetros recalculados						
S_0 , mg/L	α_0	β_s	μ_m , h ⁻¹	K_S , mg/L	x_m	r
5	$1.70 \cdot 10^{-3}$	0.663	0.054	4.171	0.974	0.999
25	$1.91 \cdot 10^{-3}$	0.182	0.054	4.171	0.981	0.990
50	$9.11 \cdot 10^{-4}$	0.093	0.054	4.171	0.799	0.966

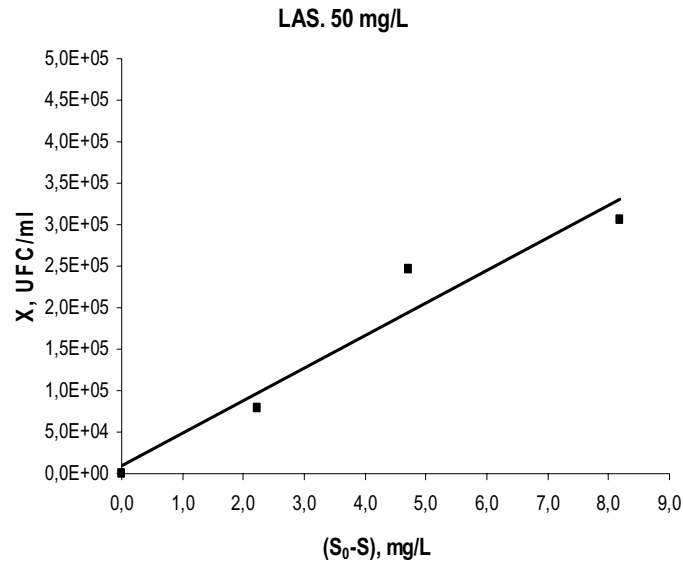


Figura V. 66.- Comprobación de la hipótesis de Gaden para el LAS a 50 mg/L

En la Figura V. 68 se comparan los valores experimentales y los calculados con este modelo, se observa un buen ajuste del modelo aplicado para las tres concentraciones ensayadas. Se ha tomado un valor medio de μ_m para las tres concentraciones estudiadas, se ha impuesto este valor y se han recalculado de nuevo el resto de los parámetros cinéticos. Para estas concentraciones, los resultados obtenidos se muestran también en la Tabla V. 45.

Para comprobar que el modelo reproduce satisfactoriamente los resultados experimentales se representa el parámetro β_S frente a la concentración, observándose una disminución de éste parámetro con la concentración de tensioactivo en el ensayo (Figura V. 67).

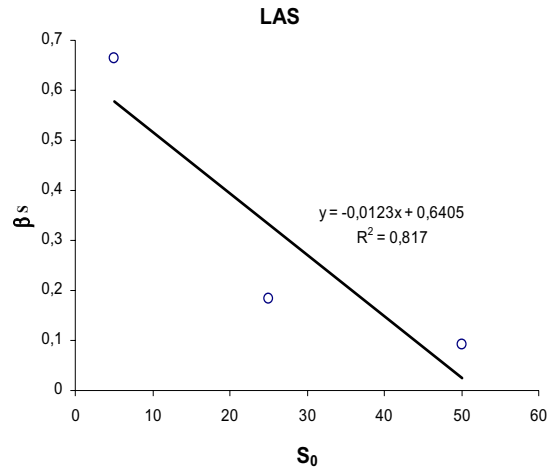


Figura V. 67.- Representación de β_s frente a la concentración inicial de tensioactivo

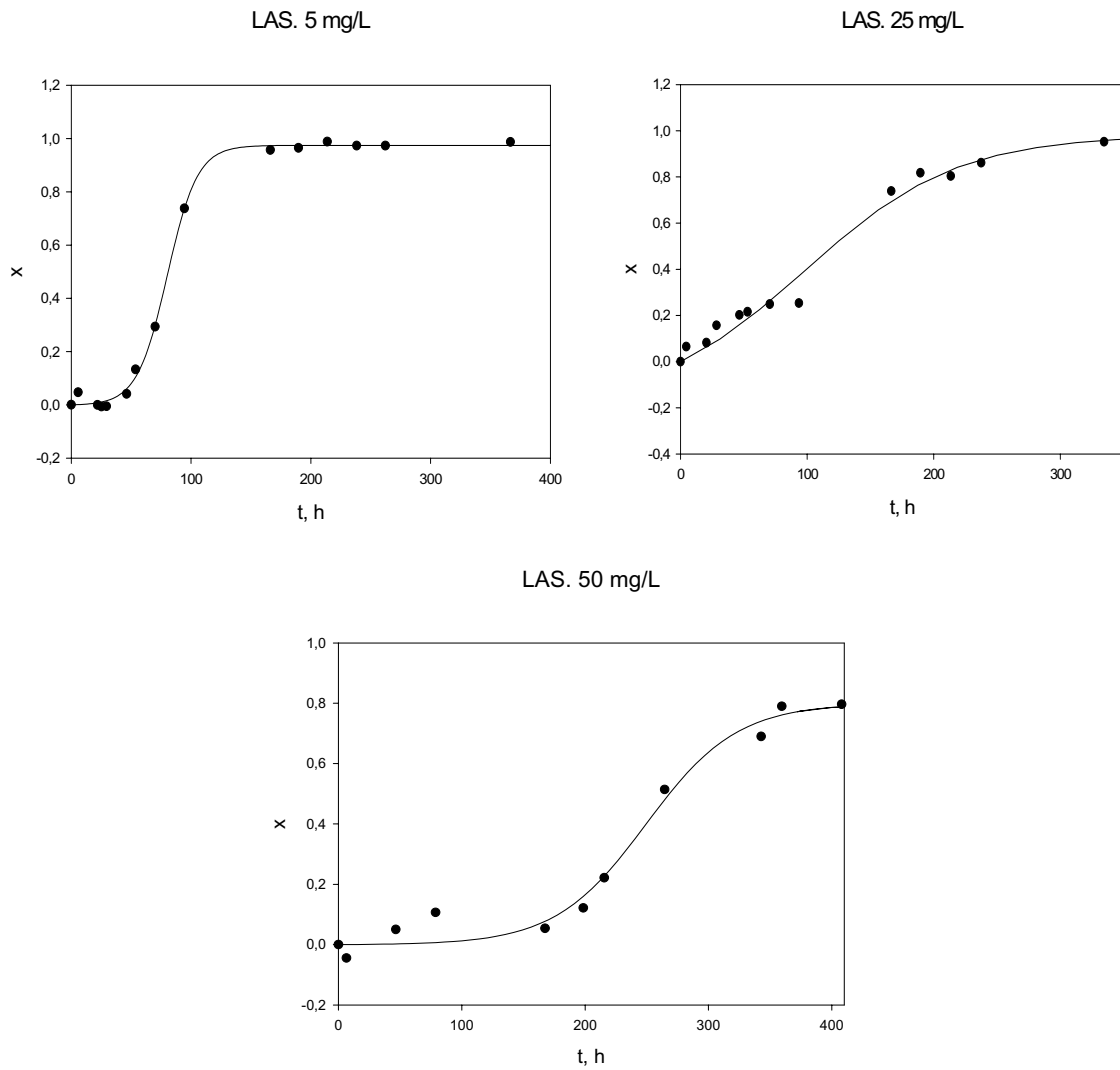


Figura V. 68.- Comparación entre los resultados experimentales y los obtenidos aplicando el modelo propuesto para el LAS a diferentes concentraciones iniciales

Teniendo en cuenta los parámetros cinéticos evaluados para los perfiles de biodegradación (Tabla V. 45) se ha aplicado el modelo cinético para evaluar el t_L y el $t_{1/2}$ según se indica en el apartado 5.2.6.2. (Ecuación V. 62). La velocidad específica de crecimiento (μ) se ha obtenido a partir de los perfiles de biodegradación primaria según la Ecuación V. 71. Los resultados se muestran en la Tabla V. 46. donde se comparan los parámetros experimentales obtenidos de los perfiles de biodegradación con los parámetros cinéticos calculados según el modelo de Monod, se observa buena concordancia entre ellos.

Tabla V. 46.- Comparación entre los parámetros experimentales y los calculados según el modelo propuesto para el LAS a diferentes concentraciones iniciales

LAS						
	Parámetros experimentales			Parámetros modelo		
S_0 , mg/L	t_L , h	$t_{1/2}$, h	μ , h ⁻¹	t_L , h	$t_{1/2}$, h	μ_m , h ⁻¹
5	38.50	78.23	0.082	52.79	80.53	0.054
25	96.23	142.74	0.010	31.65	119.93	0.054
50	182.61	251.44	0.021	179.69	270.43	0.054

En la Figura V. 69 se comparan los valores de conversión experimentales y los calculados con el modelo propuesto para las tres concentraciones ensayadas y los parámetros indicados en la Tabla V. 45, obteniéndose una desviación relativa media del 7.42 %.

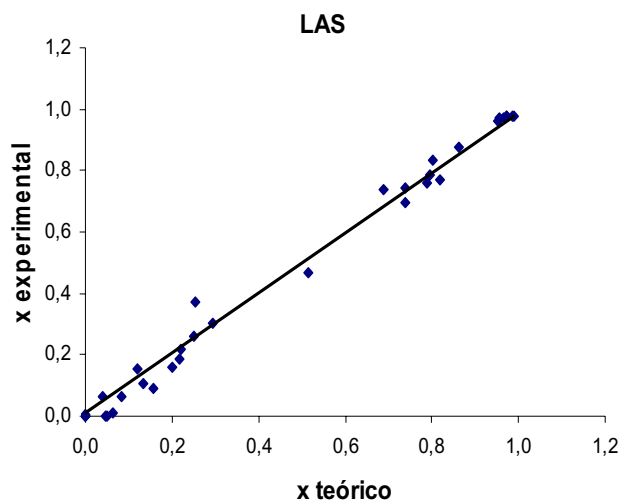


Figura V. 69.- Comparación entre los valores de conversión experimentales y calculados según el modelo propuesto para el LAS a las concentraciones de 5, 25 y 50 mg/L

5.7. COMPARACIÓN DE LA BIODEGRADABILIDAD Y CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS DE LOS TENSOACTIVOS ANALIZADOS

En la Figura V. 70, Figura V. 71 y Figura V. 72 se representan los resultados obtenidos de la comparación, para todos los tensioactivos ensayados, de los parámetros característicos que se han evaluado a partir de los perfiles de biodegradación, de las curvas de crecimiento de microorganismos y los obtenidos de la aplicación del modelo cinético propuesto (Ecuación V. 58).

En la Figura V. 70 se presenta el tiempo de latencia (t_L) y la biodegradabilidad (B) evaluada a las 50 horas del ensayo. En la Figura V. 71 se presenta la comparación para la velocidad específica de crecimiento de microorganismos (k), las unidades formadoras de colonias (UFC/ml, $_{max}$) y el rendimiento (Y_{ap}) expresado como UFC/g de sustrato, parámetros obtenidos a partir de las curvas de crecimiento de microorganismos. Finalmente en la Figura V. 72 se muestran los valores de la velocidad específica de crecimiento (μ_m) y la constante de saturación (K_S) obtenidos de la aplicación del modelo cinético propuesto.

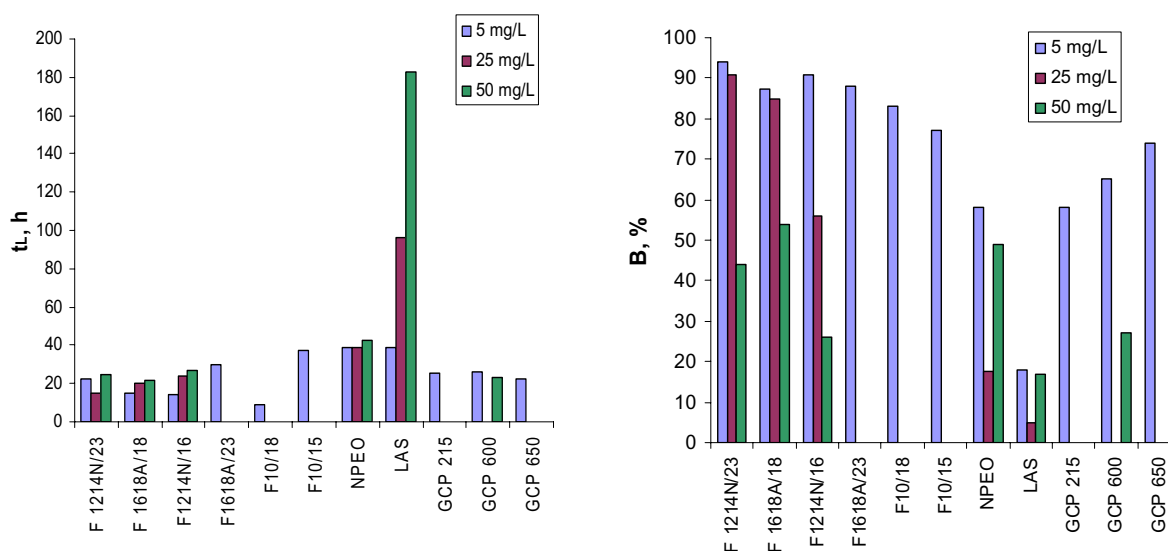


Figura V. 70.- Comparación de t_L y B para los diferentes tensioactivos ensayados

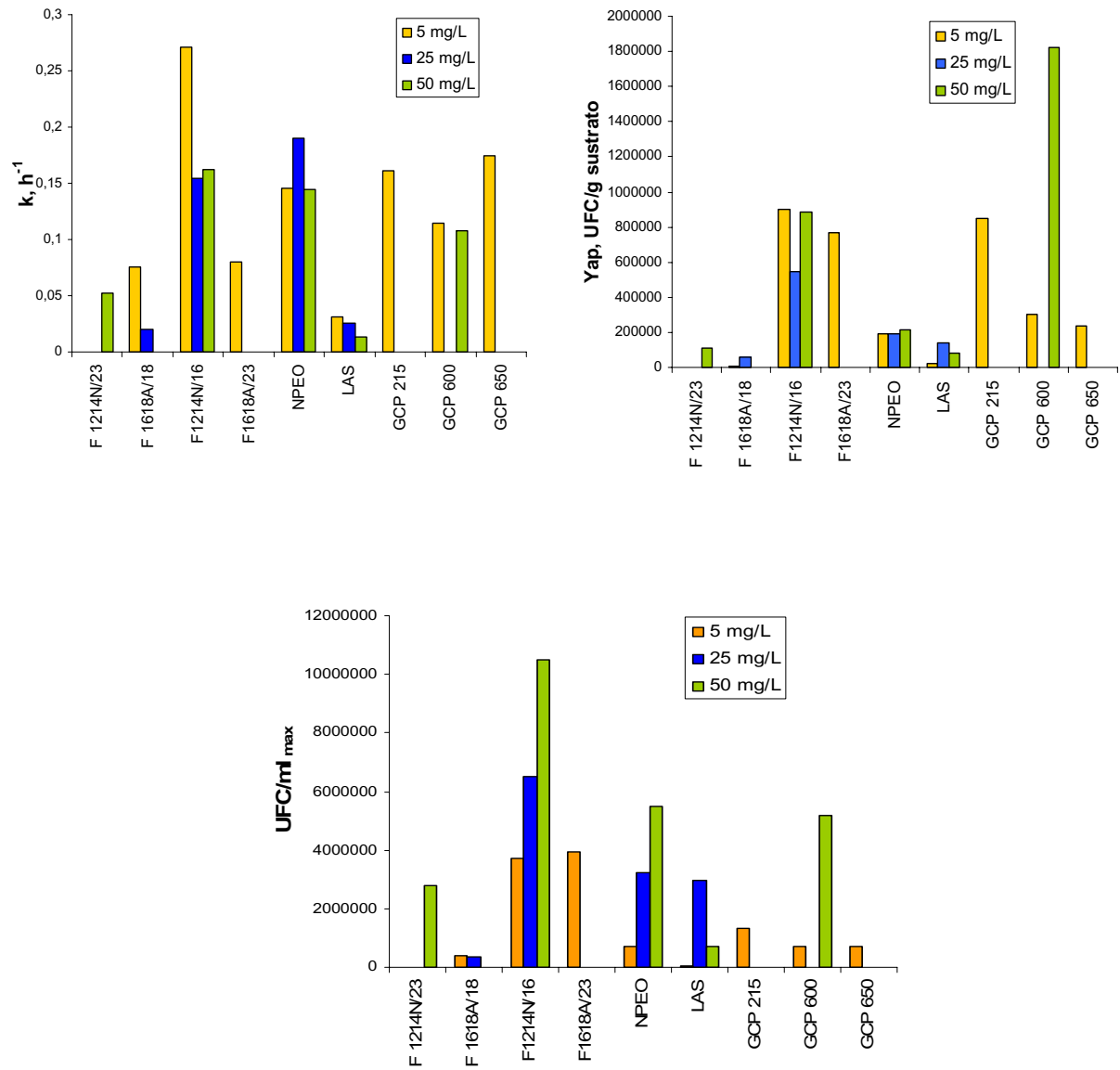


Figura V. 71.- Comparación de k , Y_{ap} y UFC/ml_{max} para los diferentes tensioactivos ensayados

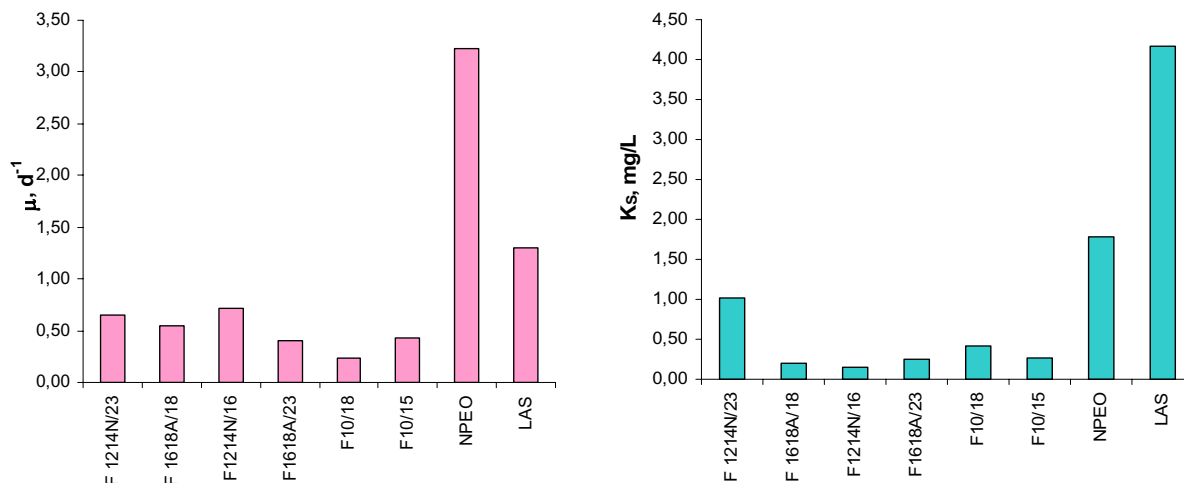


Figura V. 72.- Comparación de μ_m y K_s para los diferentes tensioactivos ensayados

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que el tiempo de latencia es prácticamente el mismo para todos los tensioactivos ensayados, excepto para el tensioactivo LAS que requiere un mayor tiempo de adaptación de los microorganismos siendo este tiempo muy superior para concentraciones altas de tensioactivo (Figura V. 70). Los resultados de biodegradabilidad a las 50 horas del ensayo ponen de manifiesto que para este tiempo los tensioactivos mas biodegradables son los alcoholes grasos etoxilados, el de menor biodegradabilidad el LAS, y que a este parámetro le afecta de forma considerable la concentración del tensioactivo ensayada disminuyendo a medida que aumenta la concentración de tensioactivo, excepto para el LAS y el NPEO. Los alquilpoliglucósidos muestran una biodegradabilidad semejante al NPEO.

Los parámetros obtenidos de las curvas de crecimiento de microorganismos indican que las velocidades mayores de crecimiento k , son las obtenidas durante el proceso de biodegradación del tensioactivo F1214N/16, NPEO y los APG, así como los mayores niveles de UFC/ml_{max} y los mayores rendimientos (Y_{ap}) por gramo de sustrato. También se observa que los valores máximos de las unidades formadoras de colonias encontrados aumentan generalmente con la concentración de sustrato ensayada excepto para el tensioactivo LAS

En la Figura V. 72 se muestran los parámetros característicos del modelo μ_m y K_s para los diferentes tensioactivos ensayados por el método estático. Los valores mayores obtenidos son para los tensioactivos NPEO y LAS. Para poder comparar los criterios de biodegradabilidad propuestos por Blok (Blok, 1996) para los ensayos respirométricos se ha tomado como referencia el tensioactivo Findet 1618 A/18 que se ha analizado mediante los dos ensayos de biodegradación. Los resultados de esta aplicación determinan que los tensioactivos alcoholes grasos etoxilados Findet 1214N/23 y Findet 1214N/16 con mayor grado de etoxilación, el NPEO y el LAS pueden considerarse fácilmente biodegradables mientras que el Findet 1618 A/23 de mayor peso molecular, y los Findet 10/18 y Findet 10/15 de menor peso molecular y menor grado de etoxilación pueden considerarse como tensioactivos de biodegradabilidad inherente en la misma forma que el GCP 600 y el GCP 650.

5.8. BIODEGRADACIÓN DE MEZCLAS DE AGE Y APG

Los detergentes constan generalmente de uno o varios tensioactivos en su formulación, lo que constituye la materia activa, el resto son componentes complementarios como los coadyuvantes o “builders”, los aditivos y los auxiliares de presentación (Sánchez-Leal, 1995). Cuando finaliza el proceso de lavado (doméstico o industrial), el agua de lavado será una disolución más o menos compleja de la suciedad eliminada y de los componentes del detergente. Se deduce fácilmente que en el medio receptor, la biodegradación de un tensioactivo se producirá en presencia de otros tensioactivos que pueden interferir en su proceso de biodegradación.

Con objeto de evaluar el efecto de los APG sobre la biodegradabilidad de los AGE, se han llevado a cabo estudios de biodegradabilidad primaria de los AGE en presencia de APG.

Dado que los tensioactivos alquilpoliglucósidos no reaccionan con el reactivo yodo yoduro, y que se comprobó que los APG no interfieren significativamente en la medida de tensioactivos etoxilados por el método del yodo yoduro (apartado 5.1.2.4.), éste ha sido el método utilizado para el seguimiento de la biodegradabilidad en el proceso de biodegradación conjunta de estos tensioactivos, donde se evalúa la concentración del tensioactivo alcohol graso etoxilado y se analiza el efecto de la presencia del alquilpoliglucósido en el proceso de biodegradación.

Los tensioactivos seleccionados han sido el AGE Findet 1214N/23 y el APG GCP 650, el menos biodegradable de los APG ensayados.

En la Figura V. 73 se representan los perfiles de biodegradación obtenidos, donde se incluye el resultado de la biodegradación del AGE en ausencia de APG. En todos los perfiles la concentración se expresa como porcentaje de tensioactivo residual a fin de poder comparar los diferentes experimentos.

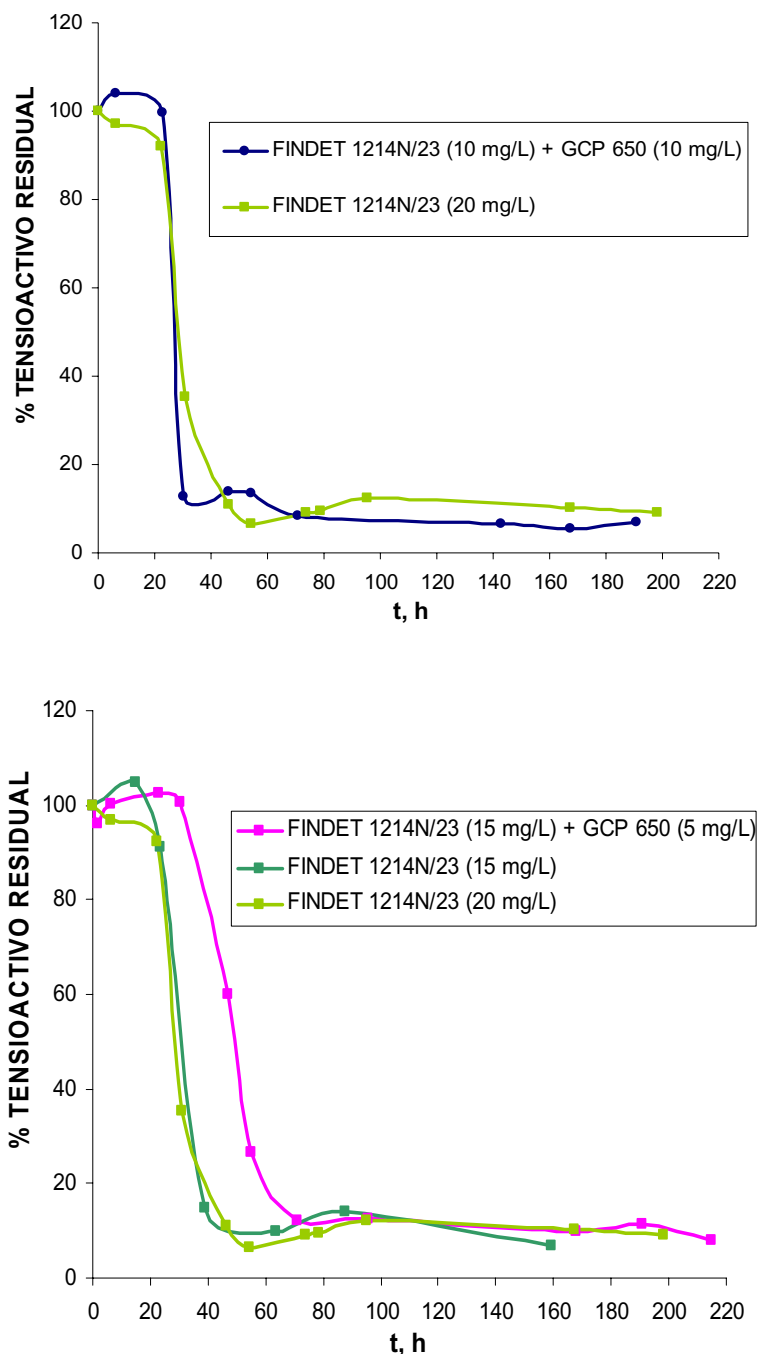


Figura V. 73.- Variación de la concentración residual de Findet 1214N/23 en ausencia y en presencia de GCP 650

Se observa que la presencia de APG no afecta a la forma de la curva de biodegradación primaria, pero si la desplaza hacia la derecha incrementándose el tiempo de latencia cuando en el proceso está presente el alquilpoliglucósido.

Para poder comparar mejor los resultados obtenidos se han calculado los parámetros característicos de los perfiles de biodegradación (apartado 5.2.3) para cada

concentración utilizada de Findet 1214N/23. Los resultados se recogen en la Tabla V. 47. en la que también se incluyen los parámetros correspondientes a los ensayos de biodegradabilidad para el tensioactivo Findet 1214N/23 sin GCP 650.

Tabla V. 47.- Parámetros característicos de los perfiles de biodegradación para el Findet 1214N/23 en ausencia y en presencia de GCP 650

FINDET 1214N/23 (10 mg/L) + GCP 650 (10 mg/L)						
S₀, mg/L	t_T, h	B, %	t_L, h	t_{1/2}, h	V_M, %/h	S_R, mg/L
10	190.75	88	22.68	25.88	2.93	0.55
FINDET 1214N/23 (15 mg/L) + GCP 650 (5 mg/L)						
S₀, mg/L	t_T, h	B, %	t_L, h	t_{1/2}, h	V_M, %/h	S_R, mg/L
15	215.00	59	29.22	47.06	1.37	1.04
FINDET 1214N/23						
S₀, mg/L	t_T, h	B, %	t_L, h	t_{1/2}, h	V_M, %/h	S_R, mg/L
15	159.00	92	22.28	30.75	2.17	0.96
20	167.50	92	22.52	27.68	2.02	1.76

Como se observa en la Tabla V. 47 el tiempo de latencia (t_L) y el tiempo total alcanzado hasta que la concentración permanece constante (t_T), aumenta cuando está presente el APG, lo que confirma que se produce un retraso en el proceso de biodegradación, del orden de 30 a 40 horas con respecto al ensayo en el que el único tensioactivo es el AGE.

También se observa que la biodegradabilidad (B) del AGE es menor en presencia del APG llegando sólo al 59% cuando se utiliza una concentración de AGE alta y se le añade APG (para la mezcla 15 mg/L de Findet y 5mg/L de GCP 650), el $t_{1/2}$ y t_T es mayor respecto al ensayo sin APG y la velocidad de biodegradación V_M es menor.

5.8.1. CRECIMIENTO DE LA BIOMASA DURANTE EL PROCESO DE BIODEGRADACIÓN CONJUNTA DE AGE Y APG

Las curvas de crecimiento de biomasa durante el proceso de biodegradación se obtuvieron simultáneamente a los perfiles de biodegradación para las mezclas tensioactivas. Los resultados se presentan en la Figura V. 74, observándose un mayor crecimiento de microorganismos cuando se incrementa la presencia de APG y se disminuye el porcentaje de AGE.

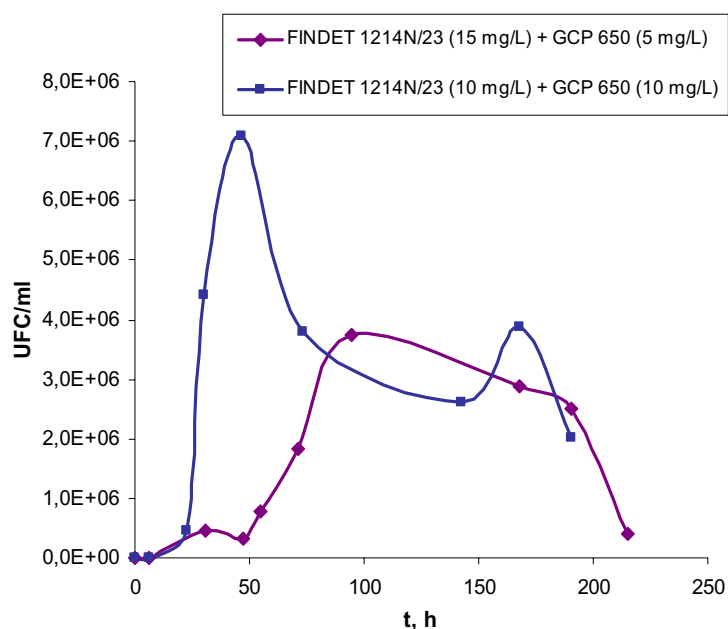


Figura V. 74.- Curvas de crecimiento de microorganismos para las mezclas Findet 1214N/23 y GCP 650

En la Figura V. 75 se presentan las curvas de crecimiento de microorganismos para el Findet 1214N/23 en ausencia y presencia de GCP 650.

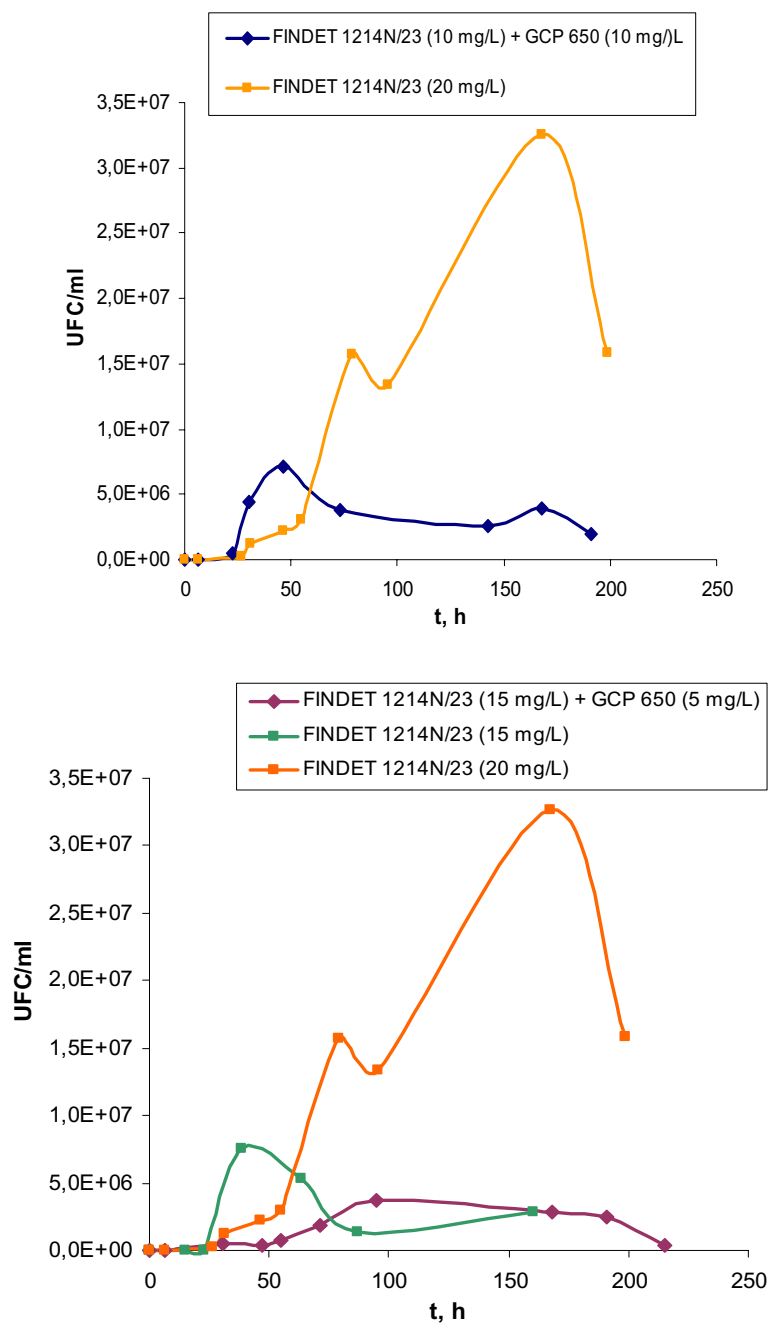


Figura V. 75.- Curvas de crecimiento de microorganismos para el Findet 1214N/23 en ausencia y en presencia de GCP 650

La observación de los perfiles de crecimiento parece indicar que son dos parámetros los que afectan al proceso de crecimiento de microorganismos, la presencia del tensioactivo GCP 650, que determina una menor formación de UFC, y la concentración del tensioactivo AGE empleado que determina una velocidad menor de crecimiento de los microorganismos, la presencia del APG no parece afectar de forma importante la velocidad

de crecimiento de microorganismos. En la Tabla V. 48 se muestran los resultados obtenidos de los perfiles de crecimiento de microorganismos observándose que el experimento realizado con 15+5 es el que implica menor unidades de colonias formadas, y el menor rendimiento obtenido.

Tabla V. 48.- Parámetros característicos de las curvas de crecimiento para el Findet 1214N/23 en presencia y en ausencia de GCP 650

FINDET 1214N/23 (10 mg/L) + GCP 650 (10 mg/L)					
S₀, mg/L	X₀, UFC/ml	UFC/ml_{max}	t_{max}, h	k, h⁻¹	Y_{ad}, UFC/g sustrato
10	2.10·10 ³	7.08·10 ⁶	46.50	0.201	8.34·10 ⁵
FINDET 1214N/23 (15 mg/L) + GCP 650 (5 mg/L)					
S₀, mg/L	X₀, UFC/ml	UFC/ml_{max}	t_{max}, h	k, h⁻¹	Y_{ad}, UFC/g sustrato
15	1.20·10 ²	3.74·10 ⁶	94.75	0.109	2.94·10 ⁵
FINDET 1214N/23					
S₀, mg/L	X₀, UFC/ml	UFC/ml_{max}	t_{max}, h	k, h⁻¹	Y_{ad}, UFC/g sustrato
15	4.30·10 ³	7.50·10 ⁶	38.75	0.207	6.13·10 ⁵
20	4.98·10 ²	1.57·10 ⁷	78.75	0.116	9.71·10 ⁵

La comparación entre el perfil de biodegradación y las curvas de crecimiento de microorganismos (Figura V. 76) pone de manifiesto que durante el tiempo de duración del ensayo, la biodegradación del Findet 1214N/23 parece realizarse en primer lugar, y durante este proceso se inicia la adaptación de los microorganismos al APG. No se observa la biodegradación de los productos intermedios en las curvas de crecimiento cuando están presentes los dos tensioactivos, como en el caso del ensayo en el que solo existe AGE. Esto determina una secuencia en la biodegradación inicial de los dos tensioactivos existentes en el proceso.

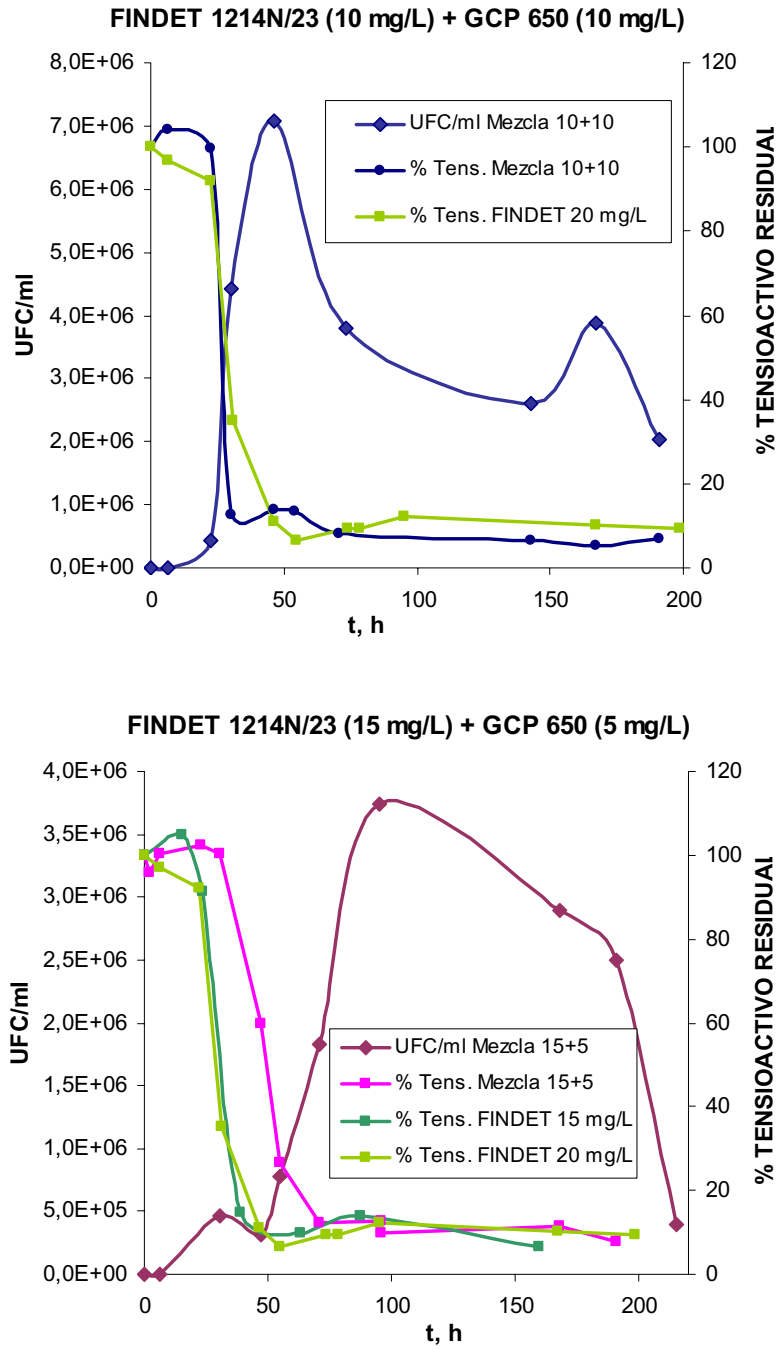


Figura V. 76.- Comparación entre el perfil de biodegradación y las curvas de crecimiento de microorganismos para las mezclas tensioactivas

5.8.2. ESTUDIO CINÉTICO DE LA BIODEGRADACIÓN PRIMARIA DE MEZCLAS DE AGE Y APG

En la Figura V. 77 se muestran los perfiles obtenidos de la aplicación del modelo de Monod que considera una concentración de tensioactivo residual (apartado 5.2.6.2., Ecuación V. 58) a las mezclas tensioactivas. En la Tabla V. 49 se presentan los parámetros característicos del modelo para las mezclas tensioactivas y para los ensayos de biodegradación del tensioactivo Findet 1214N/23 en ausencia de APG.

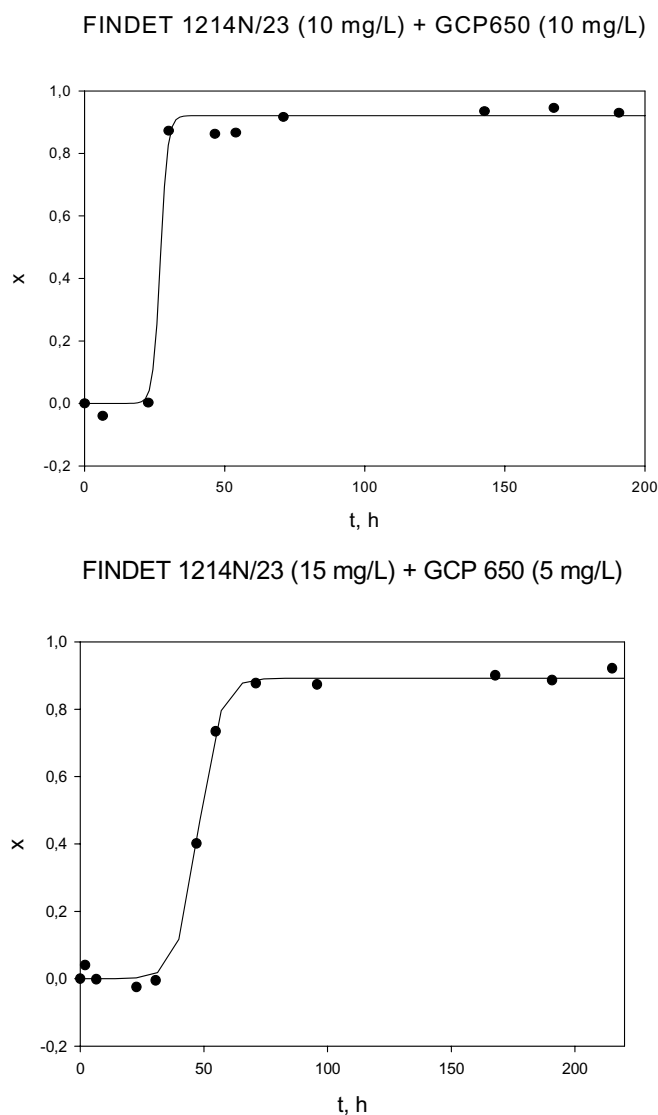


Figura V. 77.- Comparación entre los resultados experimentales y los obtenidos aplicando el modelo propuesto para las mezclas de AGE y APG

Tabla V. 49.- Parámetros característicos del modelo propuesto para el Findet 1214N/23 en presencia y en ausencia de GCP 650

FINDET 1214N/23 (10 mg/L) + GCP 650 (10 mg/L)						
S ₀ , mg/L	α ₀	β _s	μ _m , h ⁻¹	K _s , mg/L	x _m	r
10	9.84·10 ⁻¹⁰	0.098	0.081	0.980	0.921	0.980
FINDET 1214N/23 (15 mg/L) + GCP 650 (5 mg/L)						
S ₀ , mg/L	α ₀	β _s	μ _m , h ⁻¹	K _s , mg/L	x _m	r
15	1.26·10 ⁻⁵	0.061	0.016	0.915	0.892	0.921
FINDET 1214N/23						
S ₀ , mg/L	α ₀	β _s	μ _m , h ⁻¹	K _s , mg/L	x _m	r
15	3.60·10 ⁻⁵	0.067	0.027	1.009	0.897	0.996
20	1.51·10 ⁻⁶	0.050	0.027	1.009	0.903	0.997

Para considerar la magnitud del efecto observado sobre los parámetros determinados, se ha utilizado la siguiente expresión:

$$Ef_i = \left(\frac{i_{APG} - i_0}{i_0} \right)$$

Ecuación V. 93

donde:

Ef_i: efecto observado sobre el parámetro considerado

i_{APG}: valor del parámetro observado en el ensayo en presencia de APG

i₀: valor del parámetro observado en el ensayo en ausencia de APG

En la Figura V. 78 se representan los valores de efecto calculados para el ensayo de biodegradabilidad de 15 mg/L de Findet 1214N/23 en presencia de 5 mg/L de GCP 650 para los parámetros siguientes: tiempo de latencia, tiempo de vida media, velocidad media de biodegradación, biodegradabilidad, velocidad máxima de crecimiento de microorganismos y velocidad de crecimiento.

Los valores de efecto negativos indican un descenso del valor del parámetro cinético en el ensayo en presencia de APG, mientras que los valores positivos indican que

el parámetro cinético ha sufrido un aumento en el ensayo realizado en presencia de APG frente al ensayo en el que solo se empleó AGE.

Se confirma que la presencia de APG provoca un aumento del tiempo de latencia y del tiempo de vida media, una disminución de la biodegradabilidad y la velocidad media de biodegradación, así como un descenso en la velocidad de crecimiento de microorganismos.

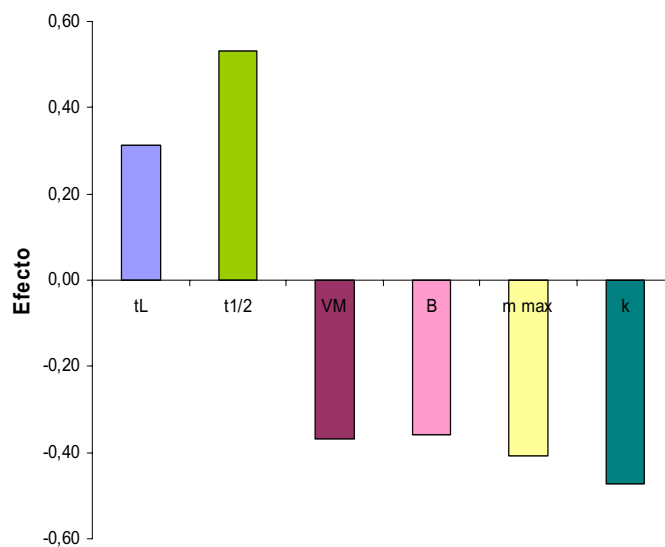


Figura V. 78.- Efecto observado para los parámetros característicos y cinéticos correspondientes al ensayo de biodegradación de 15 mg/L de Findet 1214N/23 en presencia de 5 mg/L de GCP 650

5.9. TOXICIDAD DE TENSIOACTIVOS

Desde el punto de vista toxicológico los efectos de los tensioactivos a largo plazo no son bien conocidos, aunque si se sabe que pueden provocar irritaciones en la piel y órganos internos, efectos depresivos, etc. (Llopis, 1987).

Aunque el uso de organismos bioluminiscentes como organismos de prueba en evaluación de toxicidad se conoce desde hace más de 35 años, no fue hasta hace 1980 cuando se desarrolló el ensayo Microtox como una técnica de “screening” para determinar rápidamente y de forma fiable la toxicidad de muestras acuosas (Bulich, 1979). Este tipo de bioensayos al igual que el LumiStox, presenta una gran simplicidad de operación, es un ensayo rápido y muy estandarizado, lo que permite la comparación fidedigna de datos de toxicidad, además es un ensayo que da una buena correlación con resultados obtenidos con otros bioensayos más complicados y costosos (Ribó, 1992).

Por otra parte existen estudios recientes en los que se compara el ensayo Microtox con ensayos de inhibición del consumo de oxígeno mediante fangos activados (respirometría). En dichos estudios se pone de manifiesto como el ensayo Microtox presenta mayor sensibilidad, repetitividad y precisión aunque la respirometría caracteriza mejor la toxicidad de las aguas residuales que se depuran en una EDAR, porque simula el proceso de tratamiento biológico (Gutiérrez, 2002).

La medida de la toxicidad de tensioactivos se ha realizado mediante el ensayo LumiStox conforme a la norma NORMA UNE-EN ISO 11348-2 (UNE-EN ISO 11348-2), utilizando bacterias luminiscentes de la cepa *Vibrio Fischeri* como microorganismos de prueba (apartado 3.5.). Estas bacterias no patógenas emiten luz como mecanismo de liberación de energía en el curso de su metabolismo normal. La intensidad de luz emitida es, por tanto, una medida de la actividad metabólica de las bacterias. Cuando estos microorganismos están expuestos a una muestra tóxica, la emisión de luz disminuye de forma proporcional a la toxicidad de la muestra. Por tanto es un ensayo basado en la inhibición de la actividad enzimática de la luciferina, que es la enzima responsable de la bioluminiscencia en estas bacterias (Ribó, 1992).

5.9.1. DETERMINACIÓN DE LOS VALORES DE EC₂₀ Y EC₅₀

La determinación de la toxicidad se realizó para distintos tensioactivos: alcoholes y ácidos grasos etoxilados, alquilpoliglucósidos, BEROL (mezcla de AGE y APG), NPEO y LAS. Las concentraciones iniciales de tensioactivo están comprendidas entre 5 y 500 mg/L, dependiendo del tensioactivo ensayado.

El valor de la toxicidad en ensayos acuáticos se mide como EC₅₀ y EC₂₀ que son, respectivamente, la concentración de tensioactivo en mg/L que produce una inhibición del 50% y del 20% después de 15 y 30 minutos de exposición con el tóxico. Los valores de EC₅₀ y EC₂₀ se calculan dando a la función Gamma, función que evalúa las relaciones concentración-efecto, los valores 1 y 0.25, respectivamente (apartado 3.5.5.2.). Esta función Gamma es un indicador de la inhibición enzimática, más correcto y exacto que el simple porcentaje de disminución de luz (Ribó, 1992). Los valores de EC₅₀ y EC₂₀ dependen de la temperatura, del tiempo de exposición y, principalmente, de la naturaleza química de los contaminantes en la muestra.

La relación lineal entre la función Γ y la concentración de tensioactivo empleado viene dada por:

$$\log(c) = b \cdot \log(\Gamma) + \log(a)$$

Ecuación V. 94

La Figura V. 79 muestra las linealizaciones de la concentración y la función Gamma obtenidas para los tensioactivos ensayados para tiempos de incubación de 15 y 30 minutos. Los puntos representan los resultados experimentales (valor medio de dos réplicas) y la línea el ajuste de la Ecuación V. 94 a los datos.

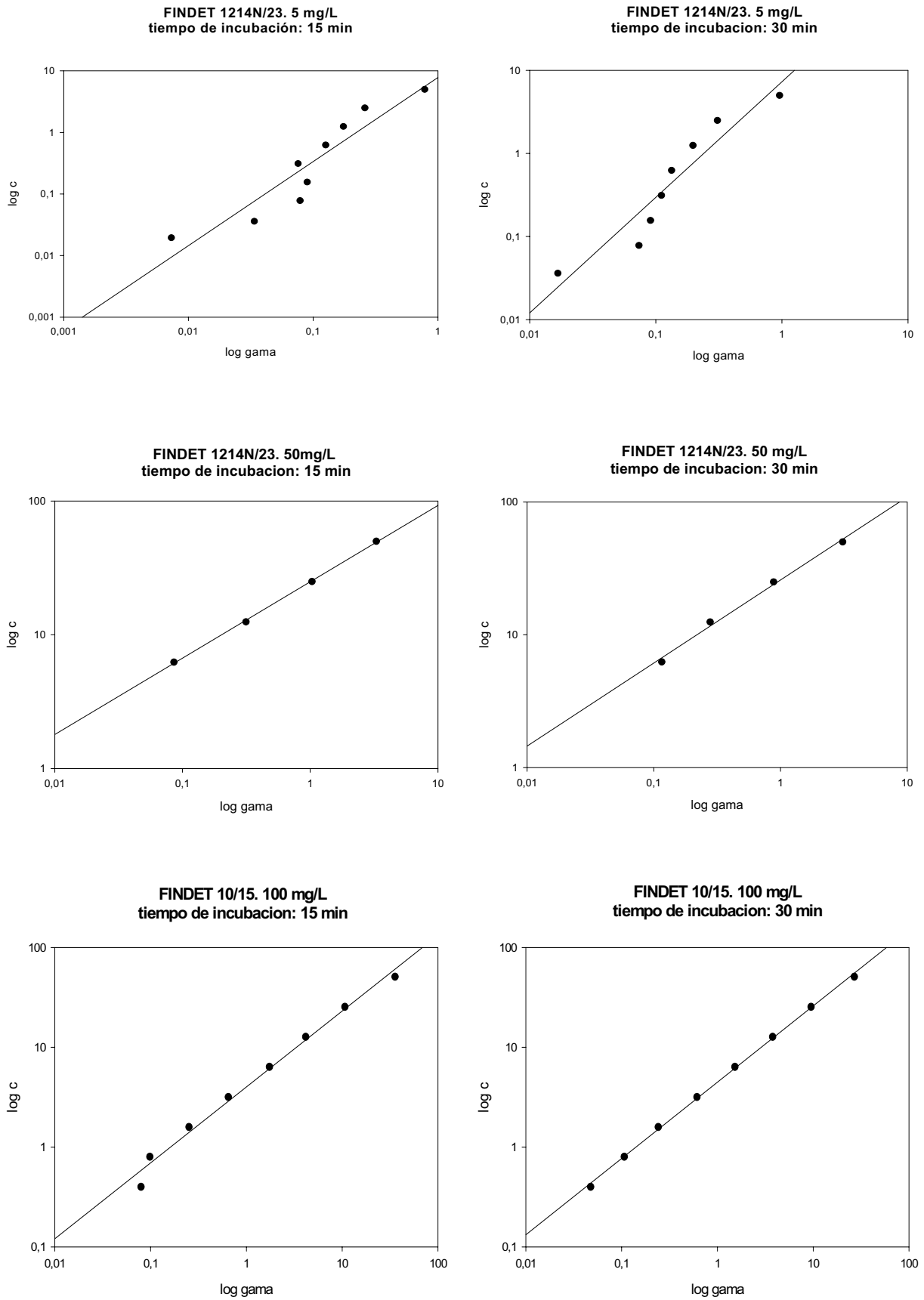


Figura V. 79.- Linealización entre la función gamma y la concentración para diferentes tensioactivos

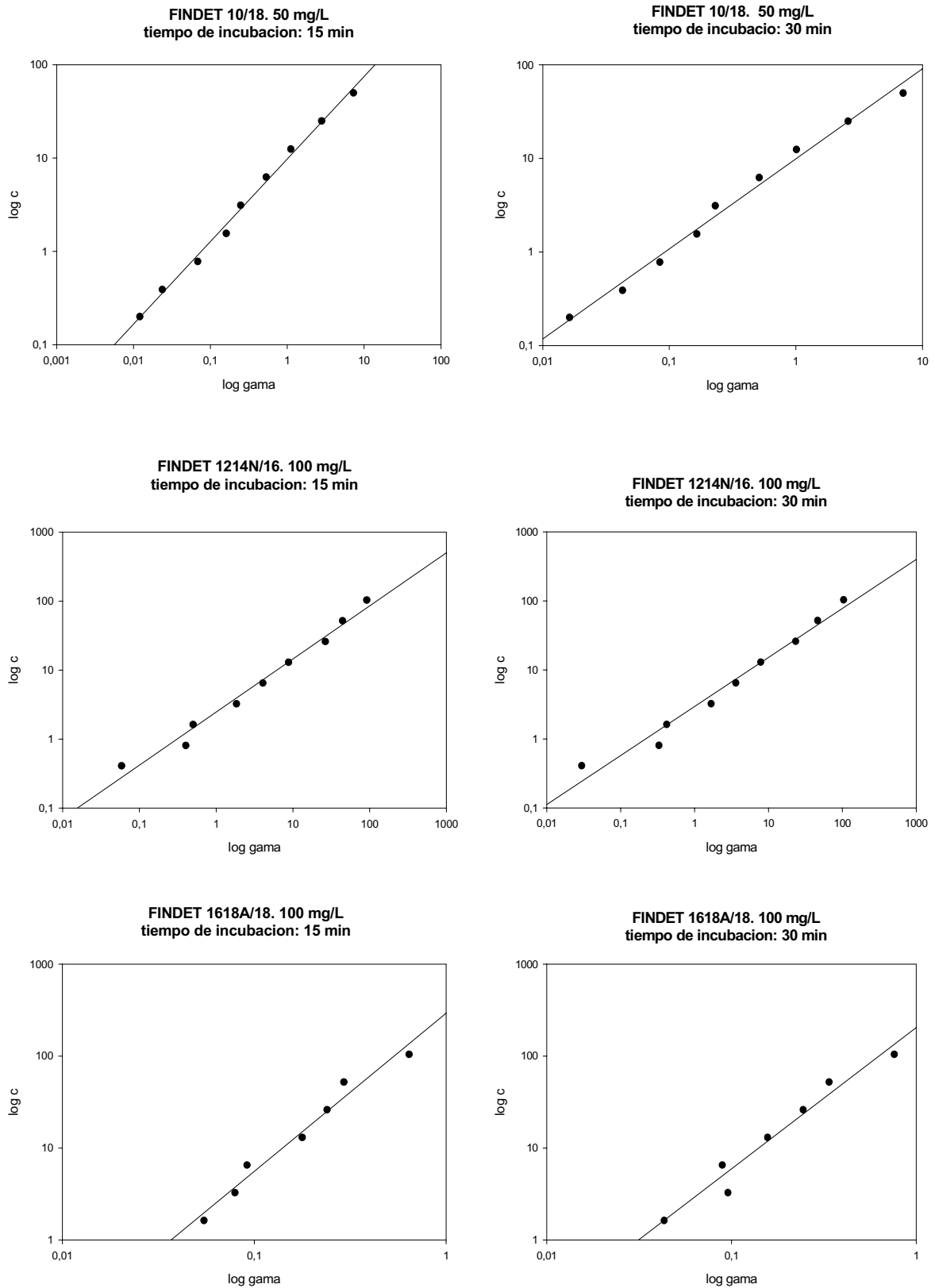


Figura V. 79. (Continuación). Linealización entre la función gamma y la concentración para diferentes tensioactivos

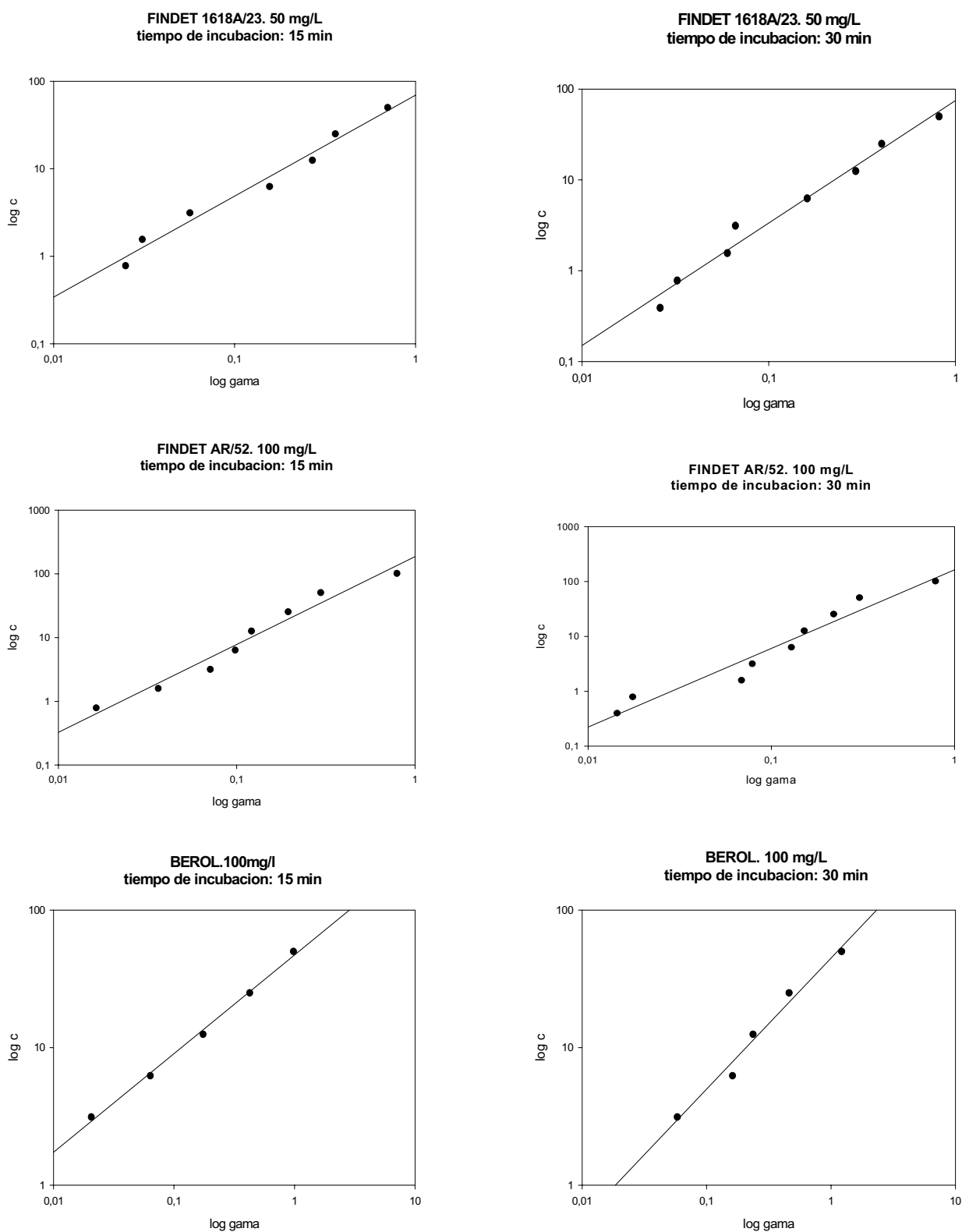


Figura V. 79. (Continuación). Linealización entre la función gamma y la concentración para diferentes tensioactivos

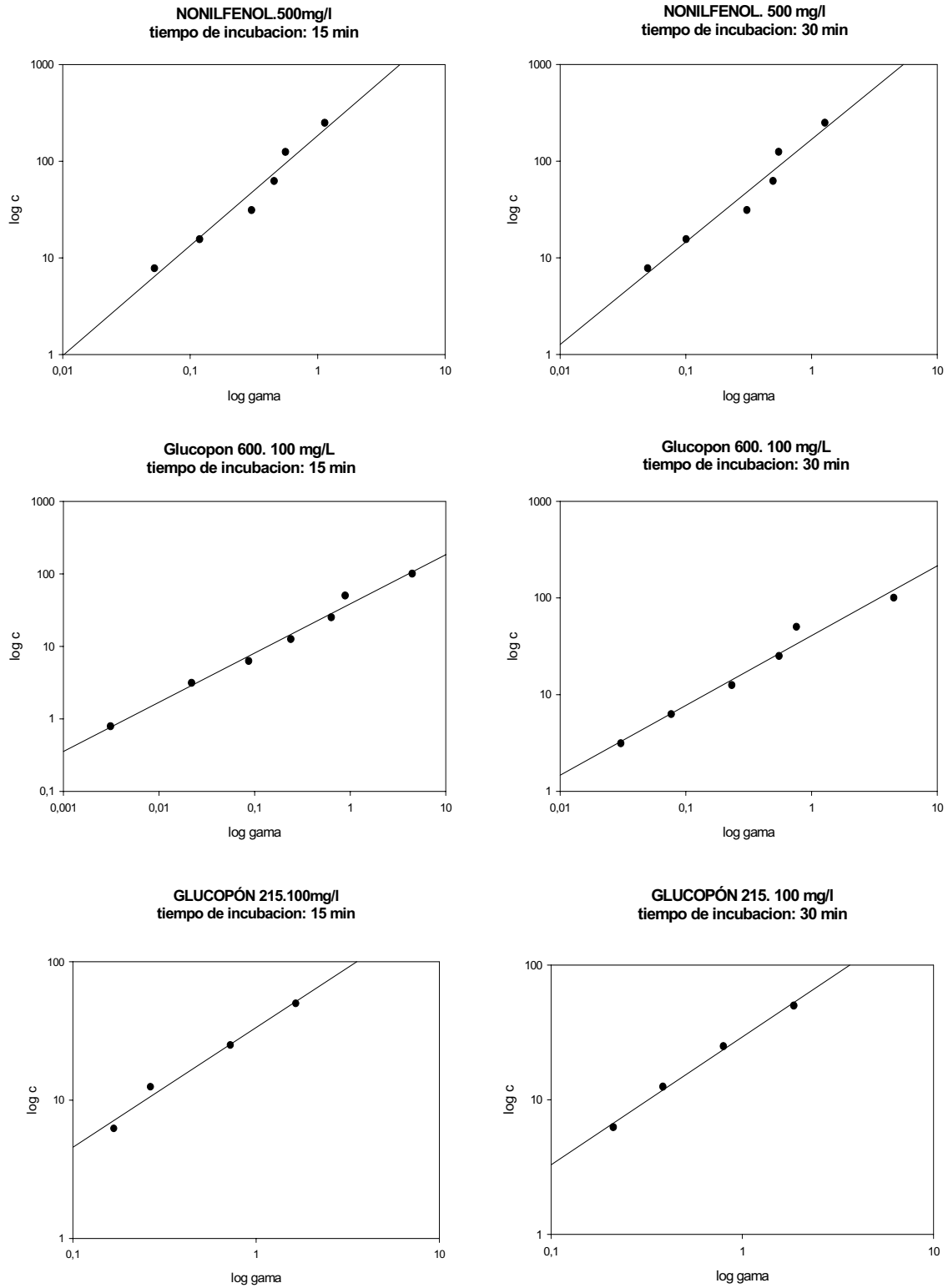


Figura V. 79. (Continuación). Linealización entre la función gamma y la concentración para diferentes tensioactivos

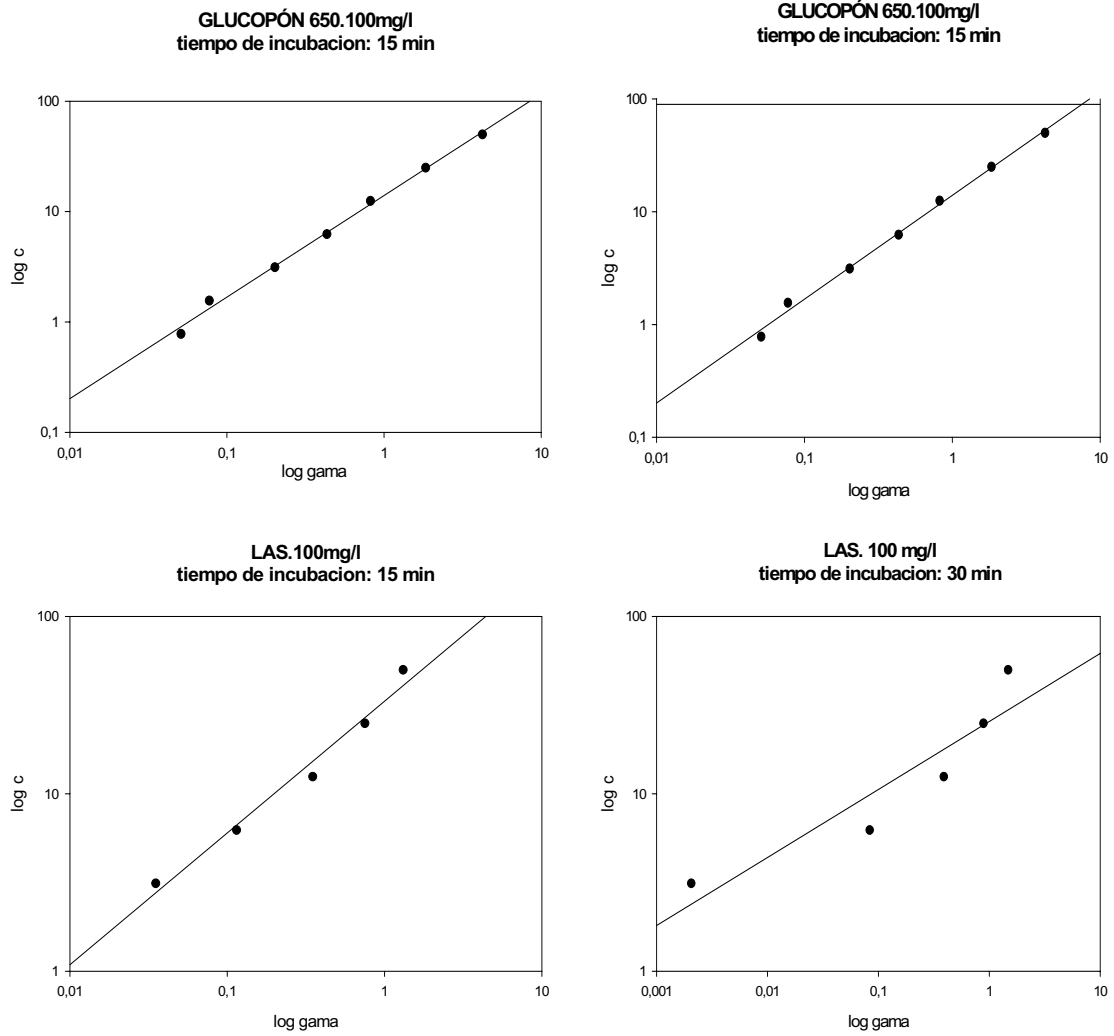


Figura V. 79. (Continuación). Linealización entre la función gamma y la concentración para diferentes tensioactivos

Los resultados obtenidos de EC₅₀ y EC₂₀ para los distintos tensioactivos ensayados se presentan en la Tabla V. 50 y en la Figura V. 80, en orden decreciente de toxicidad y para tiempos de incubación de 15 y 30 minutos.

Tabla V. 50.- Valores de EC₂₀ y EC₅₀ en mg/L para distintos tensioactivos

TENSIOACTIVO	EC ₂₀ (15 min)	EC ₅₀ (15 min)	EC ₂₀ (30 min)	EC ₅₀ (30 min)
FINDET 1214N/16	0,47	1,24	0,43	1,42
FINDET 10/15	0,72	2,01	0,71	2,21
FINDET 10/18	1,37	4,76	1,20	4,80
GLUCOPÓN 650	3,86	13,81	3,97	14,41
FINDET 1214N/23	5,54	12,67	5,93	13,26
FINDET 1618A/23	6,22	37,18	5,81	35,64
GLUCOPON 600	7,46	13,40	7,32	19,53
LAS	9,41	27,58	8,29	26,50
GLUCOPÓN 215	10,12	29,05	6,21	25,59
BEROL	12,81	46,39	17,49	51,88
FINDET 1618A/18	12,27	146,53	13,16	85,78
FINDET AR/52	12,30	91,38	12,90	83,26
NONILFENOL	29,29	160,64	26,53	162,90

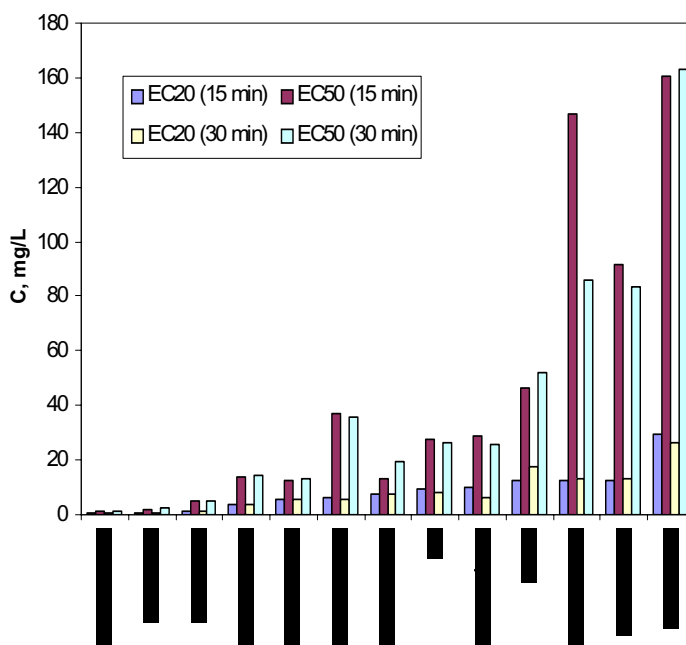


Figura V. 80.- Valores de EC₂₀ y EC₅₀ en mg/L para distintos tensioactivos

La toxicidad de los AGE presenta un desafío a los investigadores, ya que éstos son mezclas complejas de homólogos, cada uno de los cuales presenta diferentes propiedades físico-químicas individuales diferentes, además son compuestos que presentan una rápida biodegradación que lleva a concentraciones en el medio que son frecuentemente inferiores a las esperadas (Battersby, 2001). Para los AGE la toxicidad (aguda o crónica) es una función de la longitud de la cadena carbonada y etoxilada. Dos tensioactivos con la misma media de longitud de cadena alquílica y unidades de OE, pero con distinta distribución de homólogos u oligómeros, pueden presentar diferentes valores de toxicidad (Morrall, 2003).

En la Figura V. 81 se presentan los valores de EC_{50} (15 min) para los AGE en función de las propiedades del tensioactivo: peso molecular (PM), número de moles de óxido de etileno (OE), balance hidrófilo-lipófilo (HLB) y parte hidrófila del tensioactivo. En estas representaciones se ha excluido el Findet 1618A/18 que presenta resultados anómalos.

Las relaciones obtenidas y el correspondiente coeficiente de determinación son las siguientes:

$$EC_{50} (15 \text{ min}) = 0.032 \cdot (\text{PM}) - 8.482 \quad (R^2=0.990).$$

$$EC_{50} (15 \text{ min}) = 1.670 \cdot (\text{OE}) - 3.867 \quad (R^2=0.994).$$

$$EC_{50} (15 \text{ min}) = 0.008 \cdot e^{0.513 \cdot \text{HLB}} \quad (R^2=0.932).$$

$$EC_{50} (15 \text{ min}) = 0.038 \cdot (\text{Parte hidrófila}) - 4.512 \quad (R^2=0.994).$$

De los resultados obtenidos se puede concluir, para los AGE, que la toxicidad parece ser mayor para menor tamaño de la molécula, ya sea por número de óxidos de etileno como por longitud de cadena carbonada. De forma general se sabe que la toxicidad de los tensioactivos no iónicos del tipo polietoxilados se ve incrementada al disminuir la longitud de la cadena etoxilada (Swisher, 1963; Ahel, 1985), además se cumple que los tensioactivos mas biodegradables son los menos tóxicos (Sánchez-Leal, 1995). La toxicidad también es mayor para tensioactivos de menor peso molecular y para aquellos que presentan menor HLB. Esto se cumple para todos los AGE ensayados excepto para el Findet 1618A/18 que presenta un comportamiento anómalo.

Además de estos hechos, numerosos estudios encaminados a establecer relaciones estructura-actividad han concluido que los AGE que presentan mayor hidrofobicidad (ya

sea por mayor tamaño de cadena carbonada o menor longitud de cadena etoxilada) muestran valores más altos de toxicidad (Roberts, 1991, Wong, 1997), y que por lo tanto la hidrofobicidad es un buen parámetro para predecir la toxicidad de AGE. Recientemente se han obtenido datos más precisos de las relaciones estructura-actividad utilizando modelos de ecosistemas (mesocosmos), (Belanger, 2000).

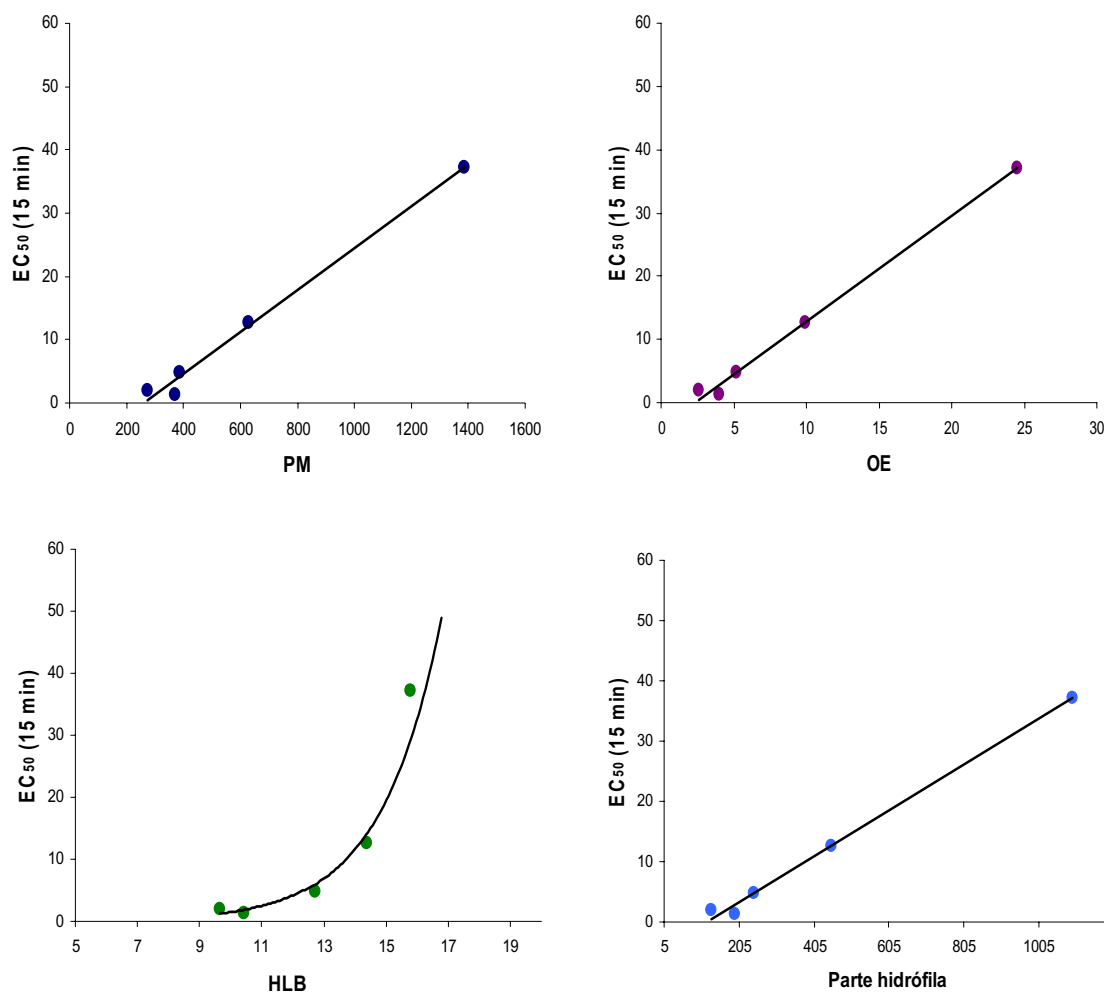


Figura V. 81.- Variación de la EC_{50} (15 min) de los AGE con diferentes propiedades del tensioactivo

El tensioactivo aniónico ensayado (LAS) presenta una toxicidad intermedia con un valor de EC_{50} (15 min) de 27.58 mg/L. Otros investigadores encontraron para el LAS un EC_{50} (15 min) de 35.95 mg/L (Perales, 2001).

Los alquilpoliglucósidos tienen valores de EC_{50} (15 min) comprendidos entre 14 y 29 mg/L, siendo menos tóxico el de menor cadena carbonada y menor contenido en glucosa (GCP 215). García y col. (García, 1997) determinaron la toxicidad aguda con *Daphnia magna* para APG comerciales con tamaños de cadena entre C_9 - C_{16} encontrando que las mezclas de APG más hidrofóbicas, es decir, de mayor cadena carbonada, son los productos más tóxicos para el test ensayado, obteniéndose valores de EC_{50} (30 min) entre 7 y 16 mg/L. Estudios similares también muestran como los homólogos de APG de mayor cadena alquílica presentan mayores valores de ecotoxicidad (Steber, 1995).

El tensioactivo BEROL presenta menor toxicidad que los APG ensayados, y el NPEO sería el tensioactivo menos tóxico según el test aplicado.

Si se se compara la toxicidad de los AGE con la de los de los alquilfenoles etoxilados, estos últimos resultan menos tóxicos (García, 1994), aunque los productos resultantes de la biodegradación (nonilfenol sin etoxilar o con bajo grado de etoxilación) parece que son un tanto “recalcitrantes”, por cuanto su biodegradación es más lenta que la de los correspondientes homólogos de alcoholes grasos sin etoxilar con 1 ó 2 unidades de óxido de etileno.

5.10. TOXICIDAD DE TENSIOACTIVOS DURANTE EL PROCESO DE BIODEGRADACIÓN

Con objeto de eliminar cualquier duda acerca de la labilidad ambiental de un tensioactivo, se ha estudiado la evolución de la toxicidad a lo largo del proceso de biodegradación. De este modo, se puede comprobar si se producen subproductos de biodegradación más tóxicos que el tensioactivo original, como ocurre con los tensioactivos del tipo alquilfenol etoxilados, o si por el contrario, los tensioactivos estudiados presentan una biodegradabilidad ambientalmente aceptable, esto es: que la toxicidad de los metabolitos de biodegradación es inferior a la del tensioactivo de partida y que los tensioactivos no solo son primariamente biodegradables o mineralizables.

La toxicidad de una sustancia se mide como EC_{50} o EC_{20} , que expresa la concentración que produce una inhibición de la emisión de luz del 50 % ó 20 % sobre el organismo de prueba (ISO 11348-2). En los vertidos de aguas residuales urbanas e industriales o cuando se trabaja con muestras de composición desconocida, no es posible expresar la toxicidad en términos de concentración. En estos casos la toxicidad se mide en unidades de toxicidad (TU). La unidad de toxicidad es el Equitox/m³. Una muestra de agua que produzca una inhibición del 50% sobre el organismo de prueba se dice que tiene una toxicidad de 1 Equitox/m³. Esta forma de expresar la toxicidad presenta la ventaja de que su valor es mayor cuanto mayor es la toxicidad de la muestra.

En una muestra de composición conocida su EC_{50} sería equivalente a una toxicidad de 1 Equitox/m³ si ésta se expresase en unidades de toxicidad. Las unidades de toxicidad de una muestra se calculan a partir de la dilución de la muestra (expresada como porcentaje, D_{50}) que produce una inhibición del 50% (Ribó, 1994):

$$TU = \frac{1}{D_{50}(\%)} 100, \text{Equitox/m}^3$$

Ecuación V. 95

Cuando la toxicidad de la muestra es inferior a 1 Equitox/m³, no es posible calcularla por éste método porque no existe una dilución de la muestra que produzca una

inhibición de la emisión de luz del 50 % del organismo de prueba, es decir, la concentración de sustancias inhibitorias en las muestras de ensayo es inferior a la necesaria para producir una inhibición del 50 % y a la necesaria para que el ensayo LumiStox proporcione un valor de toxicidad.

En este caso expresaremos el valor de toxicidad de la muestra como tanto por ciento de inhibición, y la variación de la toxicidad durante el ensayo de biodegradación como la variación del tanto por ciento de inhibición (Jurado, 2004).

El tanto por ciento de inhibición (efecto inhibitor) de la muestra de ensayo para un tiempo de incubación t , se calcula mediante la expresión:

$$H_t = \frac{(I_{0t}(c) - I_t(c))}{I_{0t}(c)} \cdot 100$$

Ecuación V. 96

donde

$$I_{0t}(c) = \bar{f}_k \cdot I_0(c)$$

Ecuación V. 97

siendo \bar{f}_k el factor de corrección promedio de las muestras de control, y $I_0(c)$ y $I_t(c)$ las lecturas de intensidad luminosa en la cubeta que contiene concentración c a tiempo 0 y t .

El efecto inhibitor de las muestras de ensayo se ha calculado para un tiempo de incubación de 15 minutos.

En la Figura V. 82 se ha representado la variación del porcentaje de inhibición durante el proceso de biodegradación para todos los tensioactivos ensayados. En la Figura V. 83 se ha representado para cada tensioactivo la influencia de la concentración sobre la variación del porcentaje de inhibición durante el proceso de biodegradación.

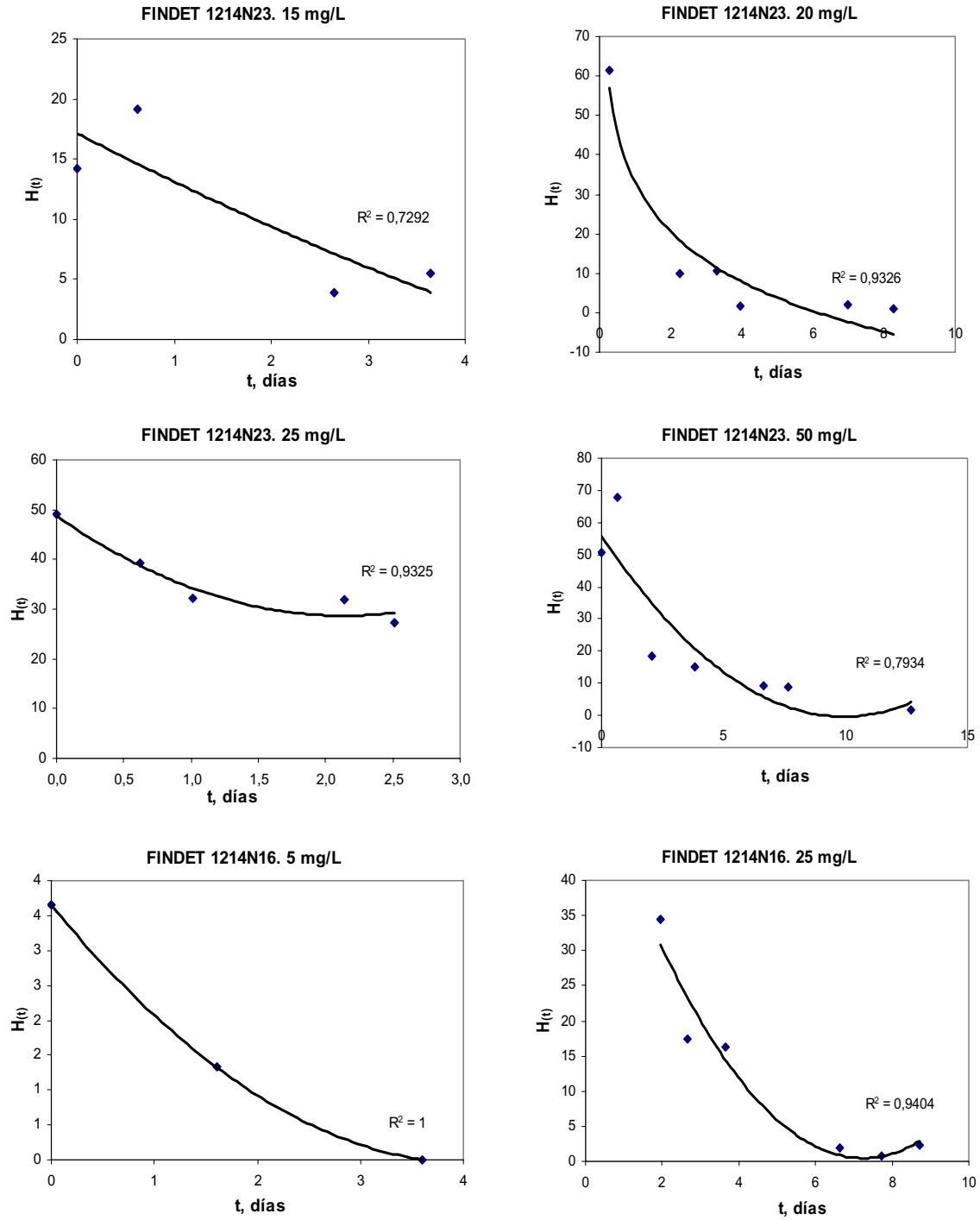


Figura V. 82.- Variación del tanto por ciento de inhibición durante el proceso de biodegradación para todos los tensioactivos ensayados

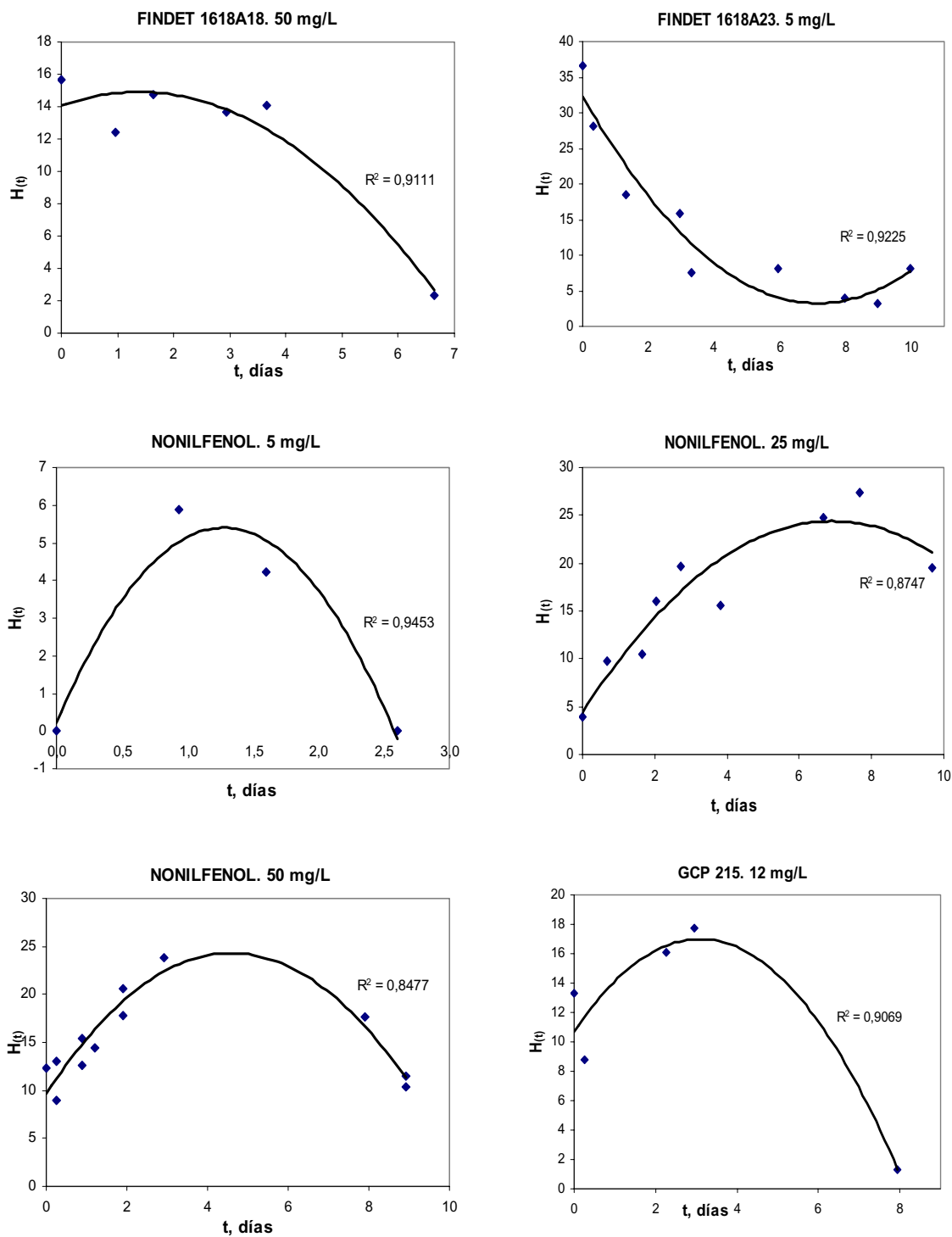


Figura V. 82. (Continuación). Variación del tanto por ciento de inhibición durante el proceso de biodegradación para todos los tensioactivos ensayados

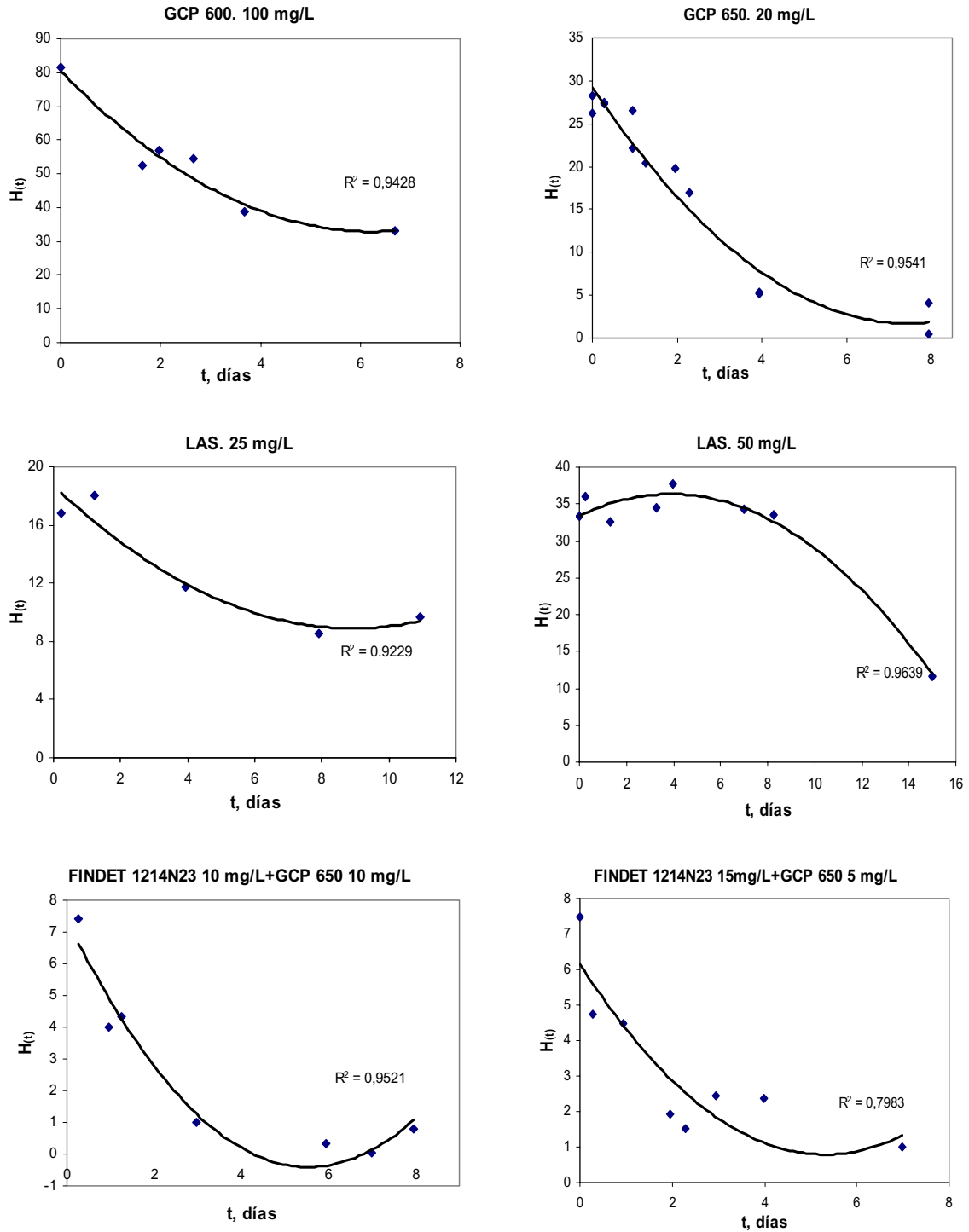


Figura V. 82. (Continuación). Variación del tanto por ciento de inhibición durante el proceso de biodegradación para todos los tensioactivos ensayados

Se observa para los AGE una disminución importante de la toxicidad durante los primeros días del ensayo de biodegradación y a todas las concentraciones ensayadas, siendo mayor el tiempo necesario para alcanzar valores de toxicidad nulos a medida que aumenta la concentración de tensioactivo (Figura V. 82).

Para el NPEO se ha seguido la evolución de la toxicidad durante el proceso de biodegradación a las concentraciones iniciales de 5, 25 y 50 mg/L (Figura V. 83), encontrándose que la toxicidad durante el proceso de biodegradación pasa por un máximo, confirmando así que los metabolitos de biodegradación resultan ser más tóxicos que el compuesto de partida. Por otra parte el máximo del % de inhibición se desplaza a tiempos inferiores (para la concentración de 50 mg/L) en el perfil de toxicidad. Este comportamiento es lógico si tenemos en cuenta que cuanto mayor es la concentración antes se alcanzan concentraciones inhibitorias.

Para los alquilpoliglucósidos GCP 215, GCP 600 y GCP 650 a las concentraciones iniciales de ensayo de 12 mg/L, 100 mg/L y 20 mg/L respectivamente, se observa que la toxicidad durante el proceso de biodegradación disminuye rápidamente, no observándose efectos tóxicos después de 7 días. Existe una correlación entre el aumento de la biodegradación del tensioactivo y la disminución de la toxicidad, esto quiere decir que los efectos tóxicos detectados son debidos al tensioactivo de partida y no a los subproductos de biodegradación. García y col. (García, 1997) estudiaron la toxicidad aguda de APG comerciales durante el proceso de biodegradación para dos ensayos tipo “screening” y a las concentraciones iniciales de 2 mg/L y 25 mg/L, encontrando una disminución rápida de la toxicidad y ningún efecto tóxico al cuarto día de ensayo.

Para el LAS se obtienen valores altos de toxicidad durante los primeros 10 días del ensayo a la concentración de 50 mg/L, produciéndose un valor nulo de toxicidad a los 15 días del ensayo.

De forma general podemos afirmar (excepto para el caso del NPEO) que los metabolitos producidos a lo largo de la biodegradación presentan una toxicidad muy inferior a la del tensioactivo original, lo que los clasifica como compuestos de “biodegradabilidad ambientalmente aceptable”.

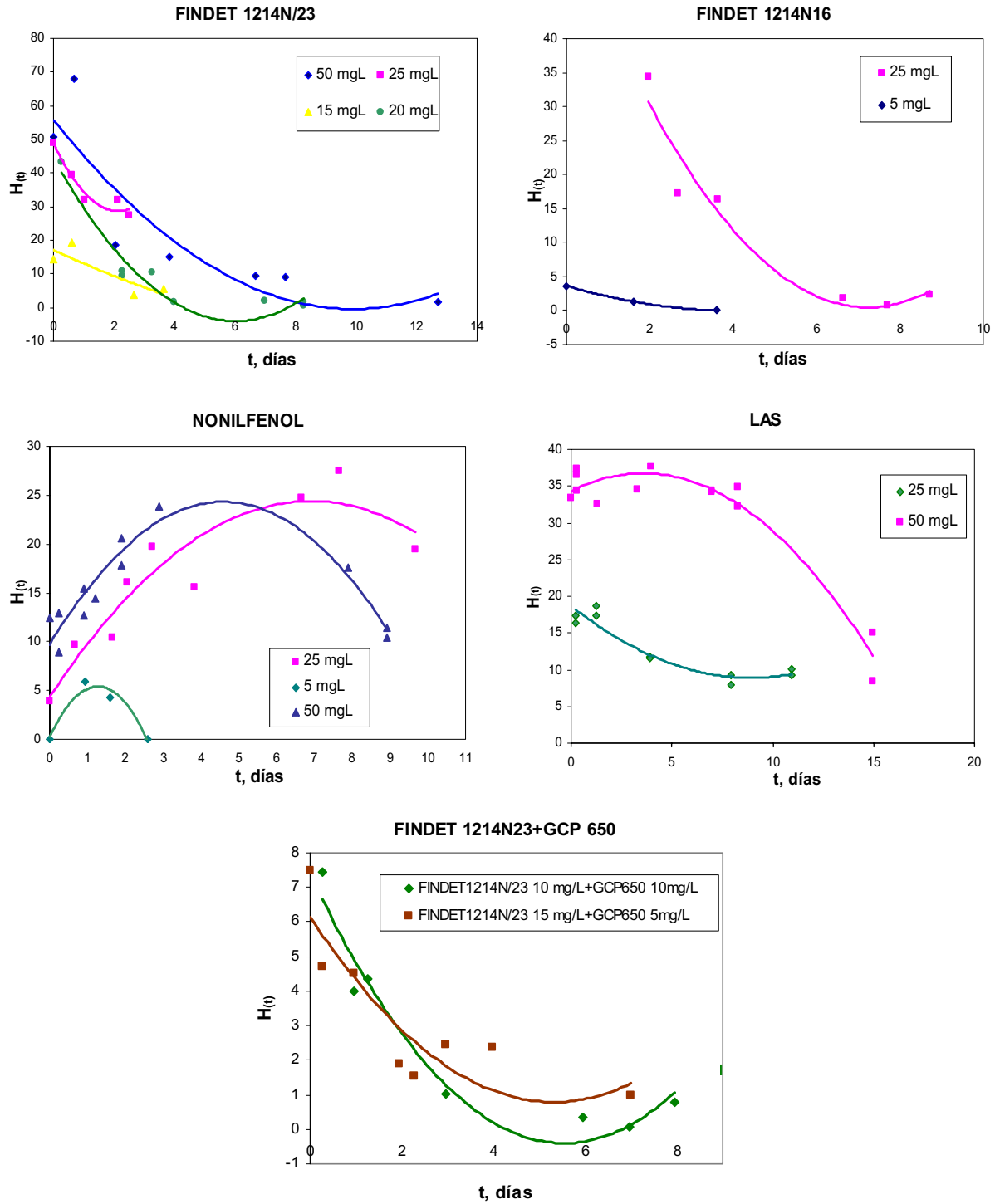


Figura V. 83.- Evolución de la toxicidad durante el proceso de biodegradación para diferentes tensioactivos

6. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones obtenidas en este trabajo de Tesis Doctoral son las siguientes:

1^a.- Para el estudio de la biodegradabilidad de tensioactivos no iónicos etoxilados realizado siguiendo la NORMA UNE 55-844-91, se ha aplicado y puesto a punto un procedimiento de análisis simplificado, basado en la formación de un complejo coloreado entre el tensioactivo no iónico y el reactivo yodo-yoduro. La bondad del método analítico depende del número de moles de óxido de etileno del tensioactivo, ya que tanto el límite de detección como la sensibilidad del método disminuyen con el n° de moles de óxido de etileno del tensioactivo ensayado. Este método puede ser aplicado para el estudio de la biodegradación de tensioactivos no iónicos cuyo grado de etoxilación sea mayor de cinco en el rango de concentraciones de 0 a 5 mg/L, rango de interés en el estudio de biodegradación en aguas residuales.

2^a.- Se ha comprobado que la presencia de tensioactivos alquilpoliglucósidos no interfieren de forma importante en la medida de alcoholes grasos etoxilados por lo que el método colorimétrico del yodo-yoduro puede utilizarse para el seguimiento de la biodegradación de mezclas de alcoholes grasos etoxilados y alquilpoliglucósidos.

3^a.- Se propone una simplificación del método normalizado para la estimación de tensioactivos aniónicos MBAS (NORMA UNE EN 903). La simplificación implica la extracción del par iónico formado entre el tensioactivo y el azul de metileno en una sola etapa, desplazando el equilibrio de transferencia del par iónico hacia la fase orgánica (cloroformo) y aumentando la relación volumen de fase orgánica /volumen de muestra ensayada en el proceso de extracción. El procedimiento propuesto elimina las etapas de filtración necesarias en el método oficial, se ha aplicado a la determinación del LAS obteniéndose resultados óptimos para una relación volumen de fase orgánica/volumen de muestra de 5/4, alcanzándose un límite de detección de 0.22 mg/L y un límite de cuantificación de 0.73 mg/L para este tensioactivo.

4°.- De los perfiles de biodegradación obtenidos para los tensioactivos, alcoholes grasos etoxilados, nonilfenol polietoxilado, y LAS se han definido parámetros característicos del proceso de biodegradación como el tiempo de latencia, biodegradabilidad, tiempo de vida media, velocidad media de biodegradación y concentración residual de tensioactivo. Estos parámetros se modifican con la concentración de tensioactivo ensayada, indicando que a medida que se incrementa la concentración de tensioactivo se produce una disminución de la velocidad del proceso de biodegradación, un incremento del tiempo de vida media, una disminución de la biodegradabilidad y un incremento de la concentración residual de tensioactivo.

5ª.- La velocidad media de biodegradación, V_M , para los alcoholes grasos etoxilados, aumenta con el número de moles de óxido de etileno del tensioactivo y el peso molecular de éste, siendo este efecto más acusado para concentraciones mayores de 25 mg/L. Este hecho se confirma con los perfiles de crecimiento de microorganismos obtenidos donde se observa una mayor concentración de UFC cuando es mayor el número de moles de OE del tensioactivo.

6ª.- Se han definido y evaluado parámetros característicos de las curvas de crecimiento de microorganismos durante el proceso de biodegradación como la velocidad específica de crecimiento k , el número máximo de unidades formadoras de colonias UFC/ml_{max} , y el rendimiento de producción de biomasa por gramo de tensioactivo tratado Y_{ap} . Estos parámetros han servido para establecer que los modelos cinéticos que explican la biodegradación de los tensioactivos ensayados: AGE, APG, NPEO y LAS son aquellos que soportan el crecimiento de microorganismos.

7ª.- La cinética de biodegradación de tensioactivos AGE, APG, NPEO y LAS puede ser explicada por modelos que soportan el crecimiento de microorganismos suponiendo Monod y cinética de primer orden. Este modelo puede ser aplicado hasta concentraciones de 25 mg/L para AGE y NPEO, hasta 20 mg/L para APG, y hasta 50 mg/L para el LAS.

8^a.- La aplicación del modelo cinético de Monod para sustratos que soportan el crecimiento para todos los tensioactivos ensayados ha permitido determinar los parámetros cinéticos característicos: la velocidad específica de crecimiento máxima μ_m y la constante de saturación K_s , parámetros necesarios para el diseño de sistemas de biodegradación para estos productos en estaciones depuradoras y que han permitido la comparación de todos los tensioactivos ensayados.

9^a.- Para concentraciones de tensioactivo elevadas: 50 mg/L para los AGE y NPEO no es aplicable el modelo cinético de Monod, para estas concentraciones se produce una inhibición de los microorganismos, por lo que se ha evaluado una constante de inhibición K_i aplicando el modelo de Andrews, esta constante ha resultado ser mayor para los tensioactivos de mayor peso molecular y mayor grado de etoxilación.

10^a.- La comparación de la biodegradación de los tensioactivos alquilpoliglucósidos y el alcohol graso etoxilado Findet 1618A/18 por el método respirométrico evaluando la DBO, ha determinado que el porcentaje de mineralización alcanzado y la velocidad específica de crecimiento de microorganismos μ sigue la secuencia GCP 215 > Findet 1618A/18 > GCP 600 > GCP 650.

11^a.- La determinación de la velocidad específica de crecimiento máxima obtenida (μ_m) para los tensioactivos AGE, NPEO y LAS aplicando el modelo cinético de Monod, y admitiendo la clasificación de biodegradabilidad según Blok (Blok, 1996), evaluada por el método respirométrico y tomando como referencia el tensioactivo Findet 1618 A/18 que se ha analizado mediante los dos procedimientos, ensayo estático y método respirométrico, ha determinado que los tensioactivos alcoholes grasos etoxilados Findet 1214N/23, Findet 1214N/16 con mayor grado de etoxilación, el NPEO y el LAS pueden considerarse fácilmente biodegradables, mientras que el Findet 1618A/23, Findet 10/18 y Findet 10/15 son tensioactivos de biodegradabilidad inherente igual que los tensioactivos GCP 600 y GCP 650.

12^a.- La determinación de la toxicidad por el ensayo Lumistox que utiliza bacterias marinas luminiscentes de la cepa *Vibrio fischeri* como microorganismo de prueba, indica que de los alcoholes grasos etoxilados ensayados el Findet 1214N/16 es el que presenta el valor de EC_{50} más bajo: 1.24 mg/L, por lo que es el más tóxico. De los alquilpoliglucósidos el GCP 650 es el más tóxico con un valor de EC_{50} de 13.81 mg/L. El menos tóxico de los tensioactivos ensayados ha sido el NPEO con 9.5 moles de óxido de etileno con una EC_{50} de 160.6 mg/L.

13^a.- La toxicidad de los AGE depende de la estructura del tensioactivo disminuyendo con el tamaño de la cadena carbonada y etoxilada. También se ha establecido una correlación entre la toxicidad y el balance hidrófilo-lipófilo de los tensioactivos HLB, encontrándose que disminuye con el aumento de ambos parámetros.

14^a.- Las medidas de toxicidad durante el proceso de biodegradación han determinado para los AGE y APG una disminución importante con el tiempo de biodegradación, siendo el nivel de toxicidad prácticamente nulo después de los 10 días del ensayo para AGE y después de los 7 días para APG. Para el tensioactivo LAS no se produce una disminución de la toxicidad durante los primeros 10 días del ensayo a concentraciones elevadas de tensioactivo 50 mg/L.

15^a.- El tensioactivo NPEO, de menor toxicidad, experimenta un aumento de la toxicidad durante el proceso de biodegradación a todas las concentraciones ensayadas, lo que permite afirmar que los metabolitos producidos durante el proceso de biodegradación presentan una toxicidad superior a la del tensioactivo de partida.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbott, D.C. (1962). The colorimetric determination of anionic surface-active materials in water. *Analyst* 87: 286-293.
- Ahel, M. (1987). Behaviour of alkylphenolpoly-ethoxylate surfactants in mechanical-biological sewage treatment. *Water Science Technology* 19: 449-460.
- Ahel, M. y Giger, M. (1985). Determination of alkylphenols and alkylphenol mono and diethoxylates in environmental samples by high performance liquid chromatography. *Analytical Chemistry*. 57: 1557-1583.
- Ahel, M., Giger, W., Molnar, E. y Ibrić, S. (2000). Determination of nonylphenol polyethoxylates and their lipophilic metabolites in sewage effluents by normal-phase high-performance liquid chromatography and fluorescence detection. *Croatica Chemica Acta* 73(1): 209-227.
- AISE-CEFIC (1999). Anaerobic Biodegradation of Surfactants. Bruselas. Bélgica: 1-75.
- Alexander, M. (1985). Biodegradation of organic chemicals. *Environmental Science Technology* 18(2): 106-111.
- Alexander, M. (1994). Biodegradation and Biorremediation. Academic Press, Inc. Londres. Inglaterra.
- Altmajer, D. (2004). Formulaciones detergentes biodegradables: Ensayos de Lavado. *Tesis Doctoral*. Departamento de Ingeniería Química. Universidad de Granada.
- Andree, H. y Middelhaue, B. (1991). Possibilities of the use of alkylpolyglucosides in detergents and cleaning liquids. *Tenside Surfactants Detergents* 28(6): 413-418.
- Ash, M. y Ash, I. (2000). Handbook of Industrial Surfactants, (3ª Edición). Chemical Publishing Company. Nueva York. EEUU.
- Ash, M. y Ash, I. (2000). Handbook of Industrial Surfactants, (3ª Edición). Chemical Publishing Company. Nueva York. EEUU.
- Bailón, R. (2003). Ingeniería del Conocimiento y Vigilancia Tecnológica Aplicada a la Investigación en el Campo de los Tensioactivos. Desarrollo de un Modelo Ciencimétrico Unificado. *Tesis Doctoral*. Departamento de Ingeniería Química. Universidad de Granada.

- Ballarin, B., Cecchi, F. y Marcomini, A. (1989). Occurrence of aromatic surfactants and their persistent metabolites in Italian sewage sludges and compost. *Estratto da Ingegneria sanitaria*: 16-22.
- Balzer, D. (1996). Properties of alkylpolyglucosides. *Tenside Surfactants Detergents* 33(2): 102-104.
- Battersby, N. S. (1990). A review of biodegradation kinetics in the aquatic environment. *Chemosphere* 21: 1243-1284.
- Battersby, N.S., Sherren, A.J., Bumpus, R.N., Eagle, R. y Molade, I.K. (2001). The fate of linear alcohol ethoxylates during activated sludge sewage treatment. *Chemosphere* 45: 109-121.
- Bayley, J. y Ollis, D. (1980). *Biochemical Engineering Fundamentals*. Ed. McGraw Hill. Nueva York. EEUU.
- Belanger, S.E., Guckert, J.W., Bowling, J.W., Begley, W.M., Davidson, D.H., LeBlanc, E.M. y Lee, D.M. (2000). Responses of aquatic communities to 25-6 alcohol ethoxylate in model stream ecosystems. *Aquatic Toxicology* 48: 135-150.
- Berna, J., Moreno, A. y Ferrer, J. (1993). An assessment of the ultimate biodegradation of LAS. *Tenside Surfactants Detergents* 30(3): 217-222.
- Berna, J.L., Ferrer, J., Moreno, A., Prats, D. y Ruiz, F. (1989). The fate of LAS in the environment. *Tenside Surfactants Detergents* 26(2): 101-107.
- Blok, J. y Struys, J. (1996). Measurement and validation of kinetic parameter values for prediction of biodegradation rates in sewage treatment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 33: 217-227.
- BOE (1985). Orden de 5 de Septiembre de 1985. BOE nº 260 de 30 de Octubre de 1985 y correcciones en BOE nº 311 del 28 de Diciembre de 1985.
- BOE (1986). Ley de Aguas 29/1985. BOE nº 103 de 30 de Abril de 1986.
- BOE (1988). Orden de 11 de Mayo de 1988 sobre características básicas de calidad que deben ser mantenidas en las corrientes de agua superficiales cuando seña destinadas a la producción de agua potable. BOE nº 124 de 24 de Mayo de 1988.
- BOE (1989). Orden de 13 de Octubre de 1989 sobre métodos de caracterización de los residuos tóxicos y peligrosos. BOE nº 270 de 10 de Noviembre de 1989.

- BOE (1990). Real Decreto 1138/90 de 14 de Septiembre de 1990 por el que se aprueba la Reglamentación técnico sanitaria para abastecimiento y control de la calidad de las aguas potables. BOE nº 226 del 20 de Septiembre de 1990.
- BOE (1995). Real Decreto 363/1995 de 10 de marzo por el que se aprueba el Reglamento sobre notificación de sustancias nuevas y clasificación, envasado y etiquetado de sustancias peligrosas. BOE nº 133 de 05 de Junio de 1995.
- BOE (1999). Real Decreto 770/1999 de 7 de Mayo por el que se aprueba la reglamentación técnico-sanitaria para la elaboración, circulación y comercio de detergentes limpiadores. BOE nº 118 de 18 de Mayo de 1999.
- BOJA (1996). Decreto de 16 de Enero por el que se aprueba el reglamento de la calidad para las aguas litorales. BOJA nº 19 de 8 de Febrero de 1996.
- BOJA (1997). Orden de 14 de Febrero de 1997 por la que se clasifican las aguas litorales andaluzas y se establecen los objetivos de calidad de las aguas afectadas directamente por los vertidos. BOJA nº 27 de 1997 de 4 de Marzo de 1997.
- Brambilla, A.M.; Calvosa, L.; Monteverdi, A.; Polesello, S.; Rindone, B. (1993). Ozone oxidación of polyethoxilated alcohols. *Water Research* 27(8): 1313-1322.
- Brigitte, A. (1992). Patente E92304513 de 19-05-92. Composiciones detergentes tipo gel, sin fosfatos, para lavavajillas automáticos. *Colgate-Palmolive Company*.
- Bulich, A.A. (1979). Use of Luminiscent bacteria for determining toxicity in aquatic environments. *Aquatic Toxicology* 98-106.
- CEE (1973a). Directiva 73/404/CEE del consejo referente a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros en materias de detergentes (DO L 347 de 17/12/1973).
- CEE (1973b). Directiva 73/405/CEE del consejo referente a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros relativas a los métodos de control de la biodegradabilidad de tensioactivos aniónicos (DO L 109 de 17/12/1973).
- CEE (1982a). Directiva 82/243/CEE referente a la aproximación de las legislaciones de los estados miembros relativas a los métodos de control de la biodegradabilidad de los tensioactivos aniónicos. Bruselas. Bélgica. DO L 109/18 de 1982.

- CEE (1982b). Directiva 82/242/CEE referente a la aproximación de las legislaciones de los estados miembros relativas a los métodos de control de la biodegradabilidad de los tensioactivos no iónicos. Bruselas. Bélgica. DO L 109/1 de 1982.
- CEE (1986). Directiva 86/94/CEE referente a la aproximación de las legislaciones de los estados miembros relativas a los métodos de control de la biodegradabilidad de los tensioactivos no iónicos (DO L 80 de 25/3/1986).
- Chitikela, S., Dentel, S.K. y Allen, H.E. (1995). Modified method for the analysis of anionic surfactants as methylene blue active substances. *Analyst* 120(2): 2001-2004.
- Closa, X. y Osett, M. (1997). El compromiso medioambiental. Dos ejemplos de la industria de detergentes. *Química e Industria*.
- COM (2002). Propuesta de Reglamento 485 de 4/9/2002 del parlamento europeo y del consejo relativo a detergentes (COD 2002/0216).
- Crabb, N. y Persinger, H. (1964). The determination of poly(oxyethylene) nonionic surfactants in water at the parts per million level. *The Journal of the American Oil Chemists' Society* 41: 752-755.
- Cuadros, L., García, A.M, Jiménez, C. y Román, M. (1993). Estimation of performance characteristics of an analytical method using the data set of the calibration experiment. *Analytical Letters* 26(6): 1243-1258.
- Cuadros, L., García, A.M. y Bosque, J.M. (1996). Statistical estimation of linear calibration range. *Analytical Letters* 29(7): 1231-1239.
- Cuadros, L., García, A.M., Bosque, J.M., González, A., Gámiz, L. y Almansa, E.V. (2002). Quimiometría: Optimización de un método de análisis químico (9ª. Edición). *Curso del Centro de Formación Continua de la Universidad de Granada*. Granada. España.
- Cuevas, M. (2001). Caracterización de tensioactivos para formulación de detergentes líquidos. *Trabajo de investigación*. Memoria del Programa de Doctorado Tecnología y Calidad de los Alimentos. Departamento de Ingeniería Química. Universidad de Granada.
- Dalton, H. y Stirling, D. (1982). Co-metabolism. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* 297: 481-496.

- Davidsohn, A.S y Milwidsky, B. (1987). *Synthetic Detergents*. 7ª Edición. Longman Scientific & Technical. Essex. Inglaterra.
- Deleu, M. y Paquot, M. (2004). From renewable vegetables resources to microorganisms: new trends in surfactants. *C.R. Chimie* 7.
- Divo, C. y Cardini, G. (1980). Primary and total biodegradation of linear alkylbenzenesulphonates. *Tenside Detergents* 17(1): 30-36.
- Dobarganes, M.C. (1975). Estudios sobre la biodegradabilidad de agentes tensioactivos no iónicos. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla.
- Domínguez, J.J.G. (1986). *Tensioactivos y Detergencia*, (Edición). Dossat, S.A., Madrid. España.
- Dominic, M.J., House, A.W. y Grahan, F.W. (2000). Environmental fate of Nonylphenol ethoxylates: differential adsorption of homologs to components of river sediment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19(22): 293-300.
- Dorado, A.P. (1996). *Detergentes*, (1ª Edición). Universidad Nacional de Educación a Distancia. Lerko Print, S.A. Madrid. España.
- Drachev, G., Semiletova, I. y Kovarskii, N. (1994). Dtergency of non-ionic surfactants in hydrophobic washing compositions. *Colloid Journal* 56(1): 34-35.
- Edwards, D., Liu, Z. y Luthy, R. (1994). Surfactant solubilization of organic compounds in soil/aqueous systems. *Journal of Environment and Engineering* 120(1): 5-22.
- Eichhorn, P y Knepper, T. (1999). Investigations on the metabolism of alkyl polyglucosides and their determination in waste water by means of liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 854: 221-232.
- Falbe, J. (1987). *Surfactants in consumer products. Theory, Technology and Applications*. Springer Verlag. Berlín. Alemania
- Fischer, W. Y Gerike, P. (1984). A surfactant balance for the input to a municipal sewage treatment plant. *Tenside Surfactants Detergents* 21(2): 71-73.
- Forgiarini, A., Esquena, J., González, C. y Solans, C. (2002). The relation between phase behavior and formation of narrow size distribution W/O emulsions. *Journal of Dispersion Science and Technology* 23(1-3): 209-217.

- Fornara, D., Pellizzon, T. y Pellizzon, M. (2000). Non irritating mixtures of anionic alkylpolyglucosides: chemical-physical properties. *5th World Surfactants Congress*: 606-615. Firenze. Italia.
- Franska, M., Franski, R., Szymanski, A. y Lukaszewski, Z. (2003). A central fission pathway in alkylphenol ethoxylate biodegradation. *Water Research* 37: 1005-1014.
- Friberg, S., Al-bawab, A. y Sandburg, J. (1999). Phase behavior of a fragrance compound system: water/phenethyl alcohol/laureth 4/glycerol. *Journal Surfactants Detergence* 2(2): 159-165.
- Fujita, M., Ike, M., Mori, K., Haku, H., Sakaguchi, Y., Asano, M., Maki, H. y Nishihara, T. (2000). Behaviour of nonylphenol ethoxylates in sewage treatment plants in Japan- biotransformation and ecotoxicity. *Water Science Technology* 42(7-8): 23-30.
- Gaden, E. (1959). Fermentation process kinetics. *Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering* 1: 63-69.
- García, J. (1986). Tensioactivos y detergencia. Dossat, S.A. Madrid. España.
- García, M., Ribosa, I., González, J., Salvia, R. y Megías, J. (1994). Estudio del impacto ambiental de tensioactivos no iónicos etoxilados. *25 Jornadas Anuales del CED* 25: 155-169. Barcelona. España.
- García, M., Ribosa, I., Campos, E., Sánchez-Leal, J. (1997). Ecological properties of alkylglucosides. *Chemosphere* 35(3): 545-556.
- Gutiérrez, M., Etxebarria, J. y de las Fuentes, L. (2002). Evaluation of waste water toxicity: comparative study between Microtox[®] and activated sludge oxygen uptake inhibition. *Water Research* 36: 914-924.
- Hallman, M., Merritt, T., Bry, K. y Berry, C. (1993). Association between neonatal care practices and efficacy of exogenous human surfactant: results of a bicenter randomized trial. *Pediatrics* 91(3): 552-560.
- Hallman, M., Spragg, R., Harrell, J., Moser, K.M. y Gluck, L. (1982). Evidence of lung surfactant abnormality in respiratory failure. *The American Society for Clinical Investigation* 70: 673-683.
- Hammerton, C. (1955). The decay of synthetic anionic detergents in natural waters. *Journal of Applied Chemistry* 5: 517-524.

- Hammerton, C. (1956). Synthetic detergents and water supplies. Part II. The chemical constitution of anionic surface surface active compounds and their susceptibility biochemical oxidation. *Proceedings of the Society for Water Treatment and Examination* 5: 145-174.
- Hedreul, C. y Frens, G. (2001). Foam stability. *Colloids and Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspect* 186(1-2): 73-82.
- Hill, K., Von Rybinski, W. y Stoll, G. (1997). Alkyl Polyglucosides: Technology, Properties and Applications. Verlag Chemie. Alemania.
- Hollis, G. (1979). Surfactants. Tergo Data. Darlington. Reino Unido.
- Holmberg, K. (2001). Natural surfactants. *Current Opinión in Colloid & Interface Science* 6(2): 148-159.
- Huddleston, R. y Allred, R. (1963). Microbial oxidation of sulphonates alkylbenzenes. *Dev. Ind. Microbial.* 4: 24-38.
- Husmann, W. (1962). Problems of biodegradation of industrial detergents and means of degradability testing. *Journal of the Society of Cosmetic Chemists*: 416-425.
- INE (2003). Instituto Nacional de Estadística. Pagina web: http://www.ine.es/pls/nomen/eip_entrada.
- INE (2004). Instituto Nacional de Estadística. (Página Web) URL: http://www.ine.es/pls/nomen/eip_entrada
- Jonkers, N., Laane, R., de Graaf, C. y de Voogt, P. (2005). Fate modelling of nonylphenol ethoxylates and their metabolites in the Dutch Scheldt and Rhine estuaries: validation with new field data. *Estuarine, Coastal and Shelf Science.* 62(1-2): 141-160
- Jurado, E., Bravo, V., Fernández-Serrano, M., Núñez-Olea, J., Luzón, G. y Lechuga, M. (2001). Biodegradación y toxicidad de tensioactivos no iónicos. *31 Jornadas Anuales del CED*: 261-273. Barcelona. España.
- Jurado, E., Fernández-Serrano, M., Núñez-Olea, J., Luzón, G. y Lechuga, M. (2002). Comparison and use of methods for the determination of non-ionic surfactants in biodegradation processes. *Tenside Surfactants Detergents* 39(5): 154-159.
- Jurado, E., Fernández-Serrano, M., Núñez-Olea, J., Luzón, G. y Lechuga, M. (2004). Effect of concentration on the kinetics of primary biodegradation of LAS and toxicity

- of the biodegradation metabolites. *34 Jornadas Anuales del CED*: 243-252. Barcelona. España.
- Karsa, D.R. y Porter, M.R. (1995). Biodegradability of surfactants, (1ª Edición). Ed. Blackie Academic & Professional. Glasgow. Reino Unido.
- Kimerle, R.A y Swisher, R.D. (1977). Reduction of aquatic toxicity of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) by biodegradation. *Water Research* 11: 31-37.
- Koga, M., Yamamichi, Y., Nomoto, Y. y Irie, M. (1999). Rapid determination of anionic surfactants by improved spectrophotometric method using methylene blue. *Analytical sciences* 15: 563-568.
- Kravetz, L., Salanitro, J.P., Dorn, P.B. y Guin, K.F. (1991). Influence of hydrophobe type and extent of branching on environmental response factors of nonionic surfactants. *The Journal of the American Oil Chemists' Society* 68(8): 610-618.
- Kreienfeld, G y Stoll, G. (1997). Surfactants in consumer products and raw material situation-a brief survey. *Alkyl Polyglycosides* 225-233.
- Kunieda, H, Ozawa, K., Aramaki, K, y Solans, C. (1998). Formation of microemulsions in mixed ionic-nonionic surfactants systems. *Langmuir* 14(2): 260-263.
- Larson, R y Payne, A. (1981). Fate of the benzene ring of linear alkylbenzene sulfonate in natural waters. *Applied and environmental microbiology* 41: 621-627.
- Larson, R. (1980). Role of biodegradation kinetics in predicting environmental fate. Maki, W. Washington. EEUU.
- Little, A. D. (1977). Human safety and environmental aspects of mayor surfactants. The Soap and Detergent Association New York. A. D. Little Inc. Cambridge. Reino Unido.
- Llopis, G.A., González, N.F., González A.J. y Creus, P.C. (1987). Problemática de la presencia de detergentes en las aguas de consumo de la provincia de Valencia. *Ars Pharmaceutica* 23 (1).
- Macbeath, F.S., Smith, A.M., You, J.F., Carvajal, G.S., Haeggberg, D.J. (1994). Patente E95901074 de 28-10-1994. Composiciones detergentes. *The Procter & Gamble Company*.

- Maceda, A. (1995). La Industria Española de Jabones y Detergentes. Aspectos Económicos y Medioambientales. *Ingeniería Química* 9.
- Madsen, T., Petersen, G., Seierø, C. y Tørsløv, J. (1996). Biodegradability and aquatic toxicity of glycoside surfactants and a nonionic alcohol ethoxylate. *The Journal of the American Oil Chemists' Society* 73(7): 929-933.
- Maguire, R.J. (1999). Review of the persistence of nonylphenol and nonylphenol ethoxylates in aquatic environments. *Water Quality Research Journal of Canada* 34(1): 37-78.
- Manzano, M.A., Perales, J.A., Sales, D. y Quiroga, J.M. (1999). The effect of temperature on the biodegradation of a nonylphenol polyethoxylate in river water. *Water Research* 33(11): 2593-2600.
- Manzano, M.A., Perales, J.A., Sales, D. y Quiroga, J.M. (1998). Effect of concentration on the biodegradation of a nonylphenol polyethoxylate in river water. *Environmental Contamination and Toxicology* 61: 489-496.
- Marcomini, A., Zanette, M., Pojana, G. y Suter, M.J. (2000). Behavior of aliphatic alcohol polyethoxylates and their metabolites under standardized aerobic biodegradation conditions. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19(3): 549-554.
- Marín, R. (1995). Compuestos orgánicos en las aguas. Presencia e importancia. *Ingeniería Química* 7.
- Martín, G.R. (1995). Compuestos orgánicos en las aguas. *Ingeniería Química* 6: 159-165.
- Matthijs, E. y Hennes, E.C. (1991). Determination of surfactants in environmental samples. *Tenside Surfactants Detergents* 28(1): 22-27.
- McEvoy, J. y Giger, W. (1985). Accumulation of linear alkylbenzenesulfonate surfactants in sewage sludges. *Naturwissenschaften* 72(8): 429-431.
- Mezzanotte, V., Bolzacchini, E., Orlandi, M., Rozzi, A. y Rullo, S. (2002). Anaerobic removal of linear alcohol ethoxylates. *Bioresource Technology* 82: 151-156.
- Monod, J. (1949). The growth of bacterial cultures. *Annual Reviews in Microbiology* 3: 371-394.

- Moreno, A. y Ferrer, J. (1984). Biodegradabilidad del LAS en los colectores y líneas que unen puntos de descarga con plantas depuradoras. *30 Jornadas Anuales del CED*: 21-34. Barcelona. España.
- Moreno, A., Ferrer, J. Y Berna, J. (1990). Biodegradability of LAS in a sewer system. *Tenside Surfactants Detergents* 27(5): 312-315.
- Morrall, D.D., Belanger, S.E. y Dunphy, J.C. (2003). Acute and chronic aquatic toxicity structure-activity relationships for alcohol ethoxylates. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 56(3): 381-3893.
- Moskvin, L.N., Nikolaeva, D.N. y Mikhailova, N.V. (1996). Determination of anionic surfactants in water with adsorption preconcentration. *Journal of Analytical Chemistry* 51(3):282-285.
- Myers, D. (1992). *Surfactant science and technology*, (2ª Edición). VCH Publishers, Inc. Nueva York. E.E.U.U.
- Nickel, D., Nitsch, C., Kurzendörfer, P. y Rybinski, W. (1992). Interfacial properties of surfactant mixtures with alkyl polyglycosides. *Progress in Colloid & Polymer Science* 89: 249-252.
- OECD (1971). *Pollution by Detergents: Determination of the Biodegradability of Anionic Synthetic Surface Active Agents*, OECD. Paris. Francia.
- OECD (1976). *Environment Directorate. Proposed Method for the Determination of the Biodegradability of Surfactants used in a Synthetic Detergents*, OECD. Paris. Francia.
- OECD (1981). *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Vol. 1, Sección 3: Degradation and Acumulation*, OECD. Paris. Francia.
- OECD (1993a). *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Vol. 1, Section 3: Degradation and Acumulation*, OECD. Paris. Francia.
- OECD (1993b). *OECD Guideline for Testing of Chemicals, "Ready Biodegradability"*, OECD. Paris. Francia.
- Okpokwasili, G. y Olisa, A. (1991). River-water biodegradation of surfactants in liquid detergents and shampoos. *Water Research* 25(11): 1425-1429.

- Osburn, Q. y Benedict, J. (1966). Polyethoxylated alkylphenols: relationship of structure to biodegradation mechanism. *The Journal of the American Oil Chemists' Society* 43: 141-146.
- Osburn, Q.W. y Benedict, J.H. (1965). Polyethoxylated alkyl phenols: relationship of structure to biodegradation mechanism. *The Journal of the American Oil Chemists' Society* 43: 141-146.
- Pagga, U. (1997). Testing biodegradability with standardized methods. *Chemosphere* 35(12): 2953-2972.
- Patozca, J. y Pulliam, G. (1990). Biodegradation and secondary effluent toxicity of ethoxylated surfactants. *Water Research* 24(8): 965-972.
- Patterson, S.J., Scott, C.C. y Tucker, B.E. (1970). Nonionic detergent degradation: III. Initial mechanism of the degradation. *The Journal of the American Oil Chemists' Society* 47: 37-41.
- Perales, J.A. (2001). Variabilidad de la biodegradación y toxicidad de compuestos xenobióticos en el medio marino. Aplicación a lineal alquilbenzeno sulfonatos en aguas del golfo de Cádiz. *Tesis Doctoral*. Departamento de Ingeniería Química, Tecnología de Alimentos y Tecnologías del Medio Ambiente. Universidad de Cádiz.
- Perales, J.A., Manzano, M.A., Sales, D. y Quiroga, J.M. (1999). Linear alkylbenzene sulphonates: biodegradability and isomeric composition. *Environmental Contamination and Toxicology* 63: 94-100.
- Pilc, J.A. y Sermon, P.A. (1987). Chromatographic separation of a wide range of ethoxylated non-ionic surfactants and their sulphonates using high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* 398: 375-380.
- Platz, G., Thuning, C., Poelicke, J., Kirchhoff, W. y Nickel, D. (1994). Phase behavior of alkyl polyglucosides in combination with fatty alcohols and alkyl sulfates. *Colloids and Surfaces, A: Physicochemical and Engineering Aspects* 88(1): 113-122.
- Prevost, A., Barbeau, J., Cote, L., Charland, R. y Faucher, E. (1998). Patente 5,731, 275 de 24-03-98. Synergistic detergent and disinfectant combinations for decontaminating biofilm-coated surfaces. *United States Patent*.

- Prieto, N., Lilienthal, W. y Tortorici, P. (1996). Correlation between spray clearing detergency and dynamic surface tension of non-ionic surfactants. *The Journal of the American Oil Chemists' Society* 73(1): 9-13.
- Quiroga, J. M. y Sales, D. (1988). Degradación de Tensioactivos aniónicos por las bacterias presentes en el agua de mar. *Ingeniería Química* 8: 103-106.
- Quiroga, J.M. y Sales, D. (1991). Surfactants biodegradation in sea water. *Tenside Surfactants Detergents* 28(3): 200-203.
- Quiroga, J.M., Perales, J.A., Romero, L.I. y Sales, D. (1999). Biodegradation kinetics of surfactants in seawater. *Chemosphere* 39(11): 1957-1969.
- Raymond, A.M. (1996). The global outlook for surfactants from a U.S. perspective. 4th *World Surfactants Congress* : 1, 21-32. Barcelona. España.
- Renner, R. (1997). European bans on surfactant trigger transatlantic debate. *Environmental Science Technology* 31: 316-320.
- Reuschenbach, P., Pagga, U. y Strotmann, U. (2003). A critical comparison of respirometric biodegradation tests based on OECD 301 and related test methods. *Water Research* 37: 1571-1582.
- Ribó, J.M. (1992). Evaluación de la contaminación química del medio acuático: el ensayo de bacterias luminiscentes. *Tecnología del Agua* 96: 36-58.
- Ribó, J.M. y Díez, M. (1994). Ejercicio de comparación interlaboratorio del ensayo de toxicidad de bacterias luminiscentes. *Tecnología del Agua* 124: 49-58.
- Ribosa, I., García, M.T., Sánchez-Leal, J. y González, J.J. (1993). *Photobacterium Phosphoreum* test data of non-ionic surfactants. *Toxicological and Environmental Chemistry* 39(3-4): 273-241.
- Richterich, K. y Steber, J. (2001). The time-window- an inadequate criterion for the ready biodegradability assessment of technical surfactants. *Chemosphere* 44: 1649-1654.
- Rin, J., Eichhorn, P., Guerrero, J.A., Knepper, T.P. y Barceló, D. (2000) Determination of linear alkylbenzenesulfonates in waste water treatment plants and coastal water by automated solid-phase extraction followed by capillary electrophoresis-UV detection and confirmation by capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 889: 221-229.

- Roberts, D.W. (1991). QSAR issues in aquatic toxicity of surfactants. *The Science of The Total Environment* 109-110: 557-568.
- Roels, J.A. (1983). *Energetics and Kinetics in Biotechnology*. Elsevier Biomedical Press.
- Romero, L. (1991). Desarrollo de un modelo matemático general para los procesos de fermentación: cinética de la degradación anaerobia. *Tesis Doctoral*. Universidad de Cádiz.
- Ruiz, J., Heredia, A. y Dobarganes, M.C. (1972). Contaminación de los cursos de agua naturales por los detergentes sintéticos. V. Determinación de la biodegradabilidad de estas sustancias. *Grasas y Aceites* 23: 439-450.
- Sabahi, N. (2004). Caracterización de Tensioactivos: Poder Espumante y Tensiones Superficiales. *Tesis Doctoral*. Departamento de Ingeniería Química. Universidad de Granada.
- Sadlowski, E.S. (1994). Patente E94931336 de 11-10-1994. Control de la precipitación de carbonato de calcio en un lavavajillas automático. *The Procter & Gamble Company*.
- Salanitro, J.P., Díaz, L.A. y Kravetz, L. (1995). Aerobic biodegradability of surfactants at low concentrations using an automated pressure transducer system. *Chemosphere* 31(3): 2827-2837.
- Salka, B. (1993). Alkyl polyglycosides: properties and applications. *Cosmetics & Toiletries* 108(3): 89-94.
- Sánchez-Leal, J. (1995). Aspectos ecológicos de los detergentes, (1ª Edición). GPE: Colección temas medioambientales. Gestió i Promoció Editorial, S.A. Barcelona. España.
- Sánchez-Leal, J., Anguera, S., Campos, E. y González, J.J. (1990). Adaptación de la técnica FIA al análisis de tensioactivos aniónicos en estudios medioambientales. *Tecnología del Agua* 65: 43-51.
- Sandbacka, M., Christianson, I. y Isomaa, B. (2000). The Acute toxicity of surfactants on Fish Cells, *Daphnia magna* and Fish – A comparative Study. *Toxicology in Vitro* 14: 61-68.

- Schmidt, S., Simkins, S. y Alexander, M. (1985). Models for the kinetics of biodegradation of organic compounds not supporting growth. *Applied and environmental microbiology* 50(2): 323-331.
- Schöberl, P. (1991). Coupling the OECD confirmatory test with continuous ecotoxicity tests. *Tenside Surfactants Detergents* 28(1): 6-14.
- Schröder, H. (1993). Surfactants: non-biodegradable, significant pollutants in sewage treatment plant effluents. *Journal of Chromatography* 647: 219-234.
- Scott, M.J. y Jones, M.N. (2000). The biodegradation of surfactants in the environment. *Biochimica et Biophysica Acta* 1505: 235-251.
- Siegfried, M.; Baumann, W. (1993). Biological degradability of alcohol ethoxylates. *Parfuemerie und Kosmetik* 74(11): 692 -698.
- Simkins, S. y Alexander, N. (1984). Models for mineralisation kinetics with the variables of substrate concentration and population density. *Applied and Environmental Microbiology* 47: 1299-1305.
- Sivak, A., Goyer, M., Perwak, J. y Thayer, P. (1982). Environmental and human aspects of commercially important surfactants. Solution behaviour of surfactants vol. I. Ed. Plenum Publishing Co: 161-188. EEUU.
- Solans, C., Pinazo, A., Caldero, G. y Infante, M. (2001). Highly concentrated emulsions as novel reaction media. *Colloids and Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspect* 176(1): 101-108.
- Sonnenschein, C. Y Soto, A.M. (1998). An update review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 65: 143-150.
- Spohn, H. y Fischer, W. (1967). Biologically hard and soft detergents in sewage treatment plants. III. *Tenside Surfactants Detergents* 4(8): 241-247.
- Steber, J., Guhl, W., Steker, N. y Schröder, F.R. (1995). Alkyl poliglycosides-ecological evaluation of a new generation of nonionic surfactants. *Tenside Surfactants Detergents* 32(6): 515-521.
- Struijs, J. y Stoltenkamp, J. (1994). Testing surfactants for ultimate biodegradability. *Chemosphere* 28(8): 1503-1523.

- Swisher, R.D. (1963). The Chemistry of surfactant biodegradation. *The Journal of the American Oil Chemists' Society* 40: 648-656.
- Swisher, R.D. (1966). Identification and estimation of LAS in waters and effluents. *The Journal of the American Oil Chemists' Society* 43: 137-140.
- Swisher, R.D. (1987). Surfactant biodegradation (2ª Edición). Marcel-Dekker Inc. Nueva York. E.E.U.U.
- Szymanski, A., Wyras, B., Zbigniew, S., Jaroszynski, T. y Lukaszewski, Z. (2000). Biodegradation of fatty alcohol ethoxylates in the continuous flow activated sludge test. *Water Research* 34(16): 4101-4109.
- Tadros, F. y Gregory, J. (1993). Colloids in the aquatic environment. Elsevier. Amsterdam. Holanda.
- The Dow Chemical Company (2004). *The Dow Chemical Company* (Página Web) URL: <http://www.dow.com/Homepage/index.html>
- UNE 55-725-87 (NORMA UNE 55-725-87). Determinación de pequeñas concentraciones de tensioactivos no iónicos en medios acuosos usando el reactivo de Dragendorff.
- UNE 55-844-91 (NORMA UNE 55-844-91). Determinación de la biodegradabilidad de agentes tensioactivos no iónicos empleados en la fabricación de formulaciones detergentes.
- UNE EN 903 (NORMA UNE EN 903). Determinación de agentes aniónicos de superficie por medición del índice de azul de metileno SAAM (ISO 7875-1:1984, modificada) (versión oficial en 903: 1993).
- UNE EN ISO 11348-2 (NORMA UNE EN ISO 11348-2). Determinación del efecto inhibitor de muestras de agua sobre la luminiscencia de *vibrio fischeri* (Ensayo de bacterias luminiscentes).
- Vandoni, M. y Goldberg, L. (1973). Behavior of surfactants in agricultural soil. *Rivista Italiana Sostanze Grasse* 50: 185-192.
- Verma, S. y Kumar, V. (1998). Relationship between oil-water interfacial tension and oily soil removal in mixed surfactants systems. *Journal of Colloid and Interface Science* 207(1): 1-10.

- 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* 673: 145-156.
- Waters, J., Garrigan, J.T. y Paulson, A.M. (1986). Investigations into the scope and limitations of the bismuth active substances procedure (Wickbold) for the determination of non-ionic surfactants in environmental samples. *Water Research* 20(2): 247-253.
- Wickbold, R. (1972). Zur Bestimmung nichtionischer. *Tenside Surfactants Detergents* 9(4): 173-177.
- Wiggins, B. y Alexander, M. (1988a). Role of chemical concentration and second carbon sources in acclimation of microbial communities for biodegradation. *Applied and environmental microbiology* 54(11): 2803-2807.
- Wiggins, B. y Alexander, M. (1988a). Role of protozoa in microbial acclimation for mineralization of organic chemicals in sewage. *Applied and environmental microbiology* 34: 661-666.
- Wiggins, B. y Alexander, M. (1988b). Role of protozoa in microbial acclimation for mineralization of organic chemicals in sewage. *Applied and environmental microbiology* 34: 661-666.
- Wiggins, B., Jones, S. y Alexander, M. (1987). Explanations for the acclimation period preceding the mineralization of organic chemicals in aquatic environments. *Applied and environmental microbiology* 53(4): 791-796.
- Willing, A. (2000). Assesment of the ecological properties of various-well known and new-nonionic surfactants. *5th World Surfactants Congress* : 1558-1566. Firenze. Italia.
- Wong, D.C.L. (1997). Acute toxicity and structure-activity relationships of nine alcohol ethoxylate surfactants to fathead minnows and *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16: 1970-1976.
- Wyrwas, B., Szymanski, A. y Lukaszewski, Z. (1993). Tensammetric studies of the separation of surfactants. Part 1. Investigation of sources of error in precipitation of

non-ionic surfactants with modified Dragendorff reagent. *Analytica Chimica Acta* 278: 197-203.

Yakabe, Y., Etoh, C., Matsunobi, Y., Katsuura, H., Miura, K. Y Yoshimura, K. (1992). Kinetic study on the biodegradation of linear alkylbenzenesulfonates (LAS) in well-water. *Chemosphere* 24(8): 969-977.

Yoshimura, K. (1986). Biodegradation and fish toxicity of non-ionic surfactants. *The Journal of the American Oil Chemists' Society* 63(12): 1590-1596.

You, J.F., Carvajal, G.S., Haeggberg, D. J. (1994). Patente E94930703 de 11-10-94. Composición para lavavajillas automáticos compactos, sin fosfato que tiene un perfil controlado de pH. *The Procter & Gamble Company*.

Zhang, C., Valsaraj, K.T., Constant, W.D. y Roy, D. (1999). Aerobic biodegradation kinetics of four anionic and non-ionic surfactants at sub-and supra-critical micelle concentrations (CMCs). *Water Research* 33(1): 115-124.

Zoller, U. (1989). Nonionic surfactants in household detergents and their distribution in the environment. *Tenside Surfactants Detergents* 6(26): 394-399.

LISTA DE TABLAS

II. Introducción:

Figura II. 1. Consumo total de tensioactivos en España en el período 1993-2003	26
Figura II. 2. Evolución del consumo de tensioactivos por tipos.....	27
Figura II. 3.- Estructura básica de un tensioactivo (Dorado, 1996).....	29
Figura II. 4.- Estructura molecular de los alcoholes grasos etoxilados.....	30
Figura II. 5.- Estructura molecular de los APEO	32
Figura II. 6.- Estructura de los Alquilpoliglucósidos	36
Figura II. 7.- Estructura molecular de los LAS	39
Figura II. 8.- Propiedades de los tensioactivos.....	41
Figura II. 9.- Principales empresas relacionadas con los tensioactivos.....	47
Figura II. 10.- Emisión de detergentes al medio ambiente.....	48
Figura II. 11.- Curva típica de biodegradación de un ensayo de biodegradación en discontinuo	71
Figura II. 12.- Evolución de la velocidad específica de crecimiento en función de la concentración de sustrato	76
Figura II. 13.- Modelos cinéticos en función de la concentración de sustrato y biomasa (Simkins, 1984)	81
Figura II. 14.- Curvas de biodegradación de compuestos de acuerdo con los modelos cinéticos mostrados en Tabla II. 11	83
Figura II. 15.- Representación gráfica de la Ecuación II. 20.....	85
Figura II. 16.- Mecanismo de biodegradación y metabolitos para la degradación aerobia de alcoholes grasos etoxilados	92
Figura II. 17.- Rutas de biodegradación del nonilfenol polietoxilado: (A) ruta hidrolítica oxidativa y (B) ruta hidrolítica no oxidativa	94
Figura II. 18.- Rutas de biodegradación de los alquilpoliglucósidos	96

Figura II. 19.- Esquema de la ruta de biodegradación aerobia del LAS	97
----------------------------------------------------------------------------	----

III. Materiales y Métodos:

Tabla III. 1.- Propiedades de los tensioactivos utilizados	118
Tabla III. 2.- Diseño de experimentos para el estudio de la biodegradabilidad de AGE..	120
Tabla III. 3.- Diseño de experimentos para el estudio de la biodegradabilidad del NPEO120	
Tabla III. 4.- Diseño de experimentos para el estudio de la biodegradabilidad de APG..	121
Tabla III. 5.- Diseño de experimentos para el estudio de la biodegradabilidad del LAS .	121
Tabla III. 6.- Diseño de experimentos para el estudio de la biodegradabilidad de mezclas de AGE y APG.....	121
Tabla III. 7.- Ensayos para el estudio de la toxicidad de diferentes tensioactivos.....	122
Tabla III. 8.- Ensayos para el estudio de la toxicidad durante el proceso de biodegradación	123
Tabla III. 9.- Reactivos para la preparación del agua residual sintética.....	133
Tabla III. 10.- Volúmenes de muestra y valores de DBO en función de la escala elgida en el equipo respirométrico.....	143
Tabla III. 11.- Recta de calibrado para la determinación de la DQO.....	168

IV. Resultados:

Tabla IV. 1.- Ensayo estático de biodegradabilidad para el tensioactivo Findet 10/15. Método del yodo-yoduro	182
Tabla IV. 2.- Ensayo estático de biodegradabilidad para el tensioactivo Findet 10/15. Método de Wickbold.....	182
Tabla IV. 3.- Ensayo estático de biodegradabilidad para el tensioactivo Findet 10/18. Método del yodo-yoduro	183

Tabla IV. 4.- Ensayo estático de biodegradabilidad para el tensioactivo Findet 1618A/18. Método del yodo-yoduro. Influencia de la concentración.....	184
Tabla IV. 5.- Ensayo dinámico de biodegradabilidad para el tensioactivo Findet 1618A/18. Método de Wickbold	185
Tabla IV. 6.- Ensayo respirométrico de biodegradabilidad para el tensioactivo Findet 1618A/18. Influencia de la concentración.....	186
Tabla IV. 7.- Ensayo estático de biodegradabilidad para el tensioactivo Findet 1618A/23. Método del yodo-yoduro	187
Tabla IV. 8.- Ensayo estático de biodegradabilidad para el tensioactivo Findet 1214N/16. Método del yodo-yoduro. Influencia de la concentración.....	188
Tabla IV. 9.- Ensayo estático de biodegradabilidad para el tensioactivo Findet 1214N/23. Método del yodo-yoduro. Influencia de la concentración.....	189
Tabla IV. 10.- Ensayo estático de biodegradabilidad para el tensioactivo Findet 1214N/23. Método de Wickbold. Influencia de la concentración.....	190
Tabla IV. 11.- Ensayo dinámico de biodegradabilidad para el tensioactivo Findet 1214N/23. Método de Wickbold.	191
Tabla IV. 12.- Ensayo estático de biodegradabilidad para el tensioactivo NPEO. Método del yodo-yoduro. Influencia de la concentración	192
Tabla IV. 13.- Ensayo estático de biodegradabilidad para el tensioactivo NPEO. Método del Wickbold	193
Tabla IV. 14.- Ensayo estático de biodegradabilidad y método de la botella cerrada para el tensioactivo GCP 215. Método del TOC.....	194
Tabla IV. 15.- Ensayo estático de biodegradabilidad y método de la botella cerrada para el tensioactivo GCP 600. Método del TOC. Influencia de la concentración	195
Tabla IV. 16.- Método de la botella cerrada para el tensioactivo GCP 650.....	196
Tabla IV. 17.- Estático y Método de la botella cerrada para el tensioactivo GCP 650.....	197
Tabla IV. 18.- Ensayo respirométrico de biodegradabilidad para el tensioactivo GCP 215. Influencia de la concentración.....	198

Tabla IV. 19.- Ensayo respirométrico de biodegradabilidad para el tensioactivo GCP 600. Influencia de la concentración.....	199
Tabla IV. 20.- Ensayo respirométrico de biodegradabilidad para el tensioactivo GCP 650	200
Tabla IV. 21.- Ensayo estático de biodegradabilidad para el LAS. Método de análisis simplificado para determinación de sustancias activas al azul de metileno. Influencia de la concentración.....	201
Tabla IV. 22.- Ensayo estático de biodegradabilidad para mezclas tensioactivas de AGE y APG. Método del yodo-yoduro. Influencia de la concentración.....	202
Tabla IV. 23.- Medida de la inhibición de la luminiscencia de bacterias <i>Vibrio fischeri</i> para el tensioactivo Findet 10/15	204
Tabla IV. 24.- Medida de la inhibición de la luminiscencia de bacterias <i>Vibrio fischeri</i> para el tensioactivo Findet 10/18	205
Tabla IV. 25.- Medida de la inhibición de la luminiscencia de bacterias <i>Vibrio fischeri</i> para el tensioactivo Findet 1618A/18	206
Tabla IV. 26.- Medida de la inhibición de la luminiscencia de bacterias <i>Vibrio fischeri</i> para el tensioactivo Findet 1618A/23	207
Tabla IV. 27.- Medida de la inhibición de la luminiscencia de bacterias <i>Vibrio fischeri</i> para el tensioactivo Findet 1214N/16	208
Tabla IV. 28.- Medida de la inhibición de la luminiscencia de bacterias <i>Vibrio fischeri</i> para el tensioactivo Findet 1214N/23	209
Tabla IV. 29.- Medida de la inhibición de la luminiscencia de bacterias <i>Vibrio fischeri</i> para el tensioactivo Findet AR/52.....	210
Tabla IV. 30.- Medida de la inhibición de la luminiscencia de bacterias <i>Vibrio fischeri</i> para el tensioactivo NPEO	211
Tabla IV. 31.- Medida de la inhibición de la luminiscencia de bacterias <i>Vibrio fischeri</i> para el LAS	212
Tabla IV. 32.- Medida de la inhibición de la luminiscencia de bacterias <i>Vibrio fischeri</i> para el tensioactivo GCP 215	213

Tabla IV. 33.- Medida de la inhibición de la luminiscencia de bacterias <i>Vibrio fischeri</i> para el tensioactivo GCP 600	214
Tabla IV. 34.- Medida de la inhibición de la luminiscencia de bacterias <i>Vibrio fischeri</i> para el tensioactivo GCP 650	215
Tabla IV. 35.- Medida de la inhibición de la luminiscencia de bacterias <i>Vibrio fischeri</i> para el tensioactivo BEROL LFG 61	216
Tabla IV. 36.- Medida de la toxicidad durante el proceso de biodegradación para el tensioactivo Findet 1618A/18 a 50 mg/L	218
Tabla IV. 37.- Medida de la toxicidad durante el proceso de biodegradación para el tensioactivo Findet 1618A/23 a 5 mg/L	219
Tabla IV. 38.- Medida de la toxicidad durante el proceso de biodegradación para el tensioactivo Findet 1214N/16 a 5 mg/L	220
Tabla IV. 39.- Medida de la toxicidad durante el proceso de biodegradación para el tensioactivo Findet 1214N/16 a 25 mg/L	220
Tabla IV. 40.- Medida de la toxicidad durante el proceso de biodegradación para el tensioactivo Findet 1214N/23 a 15 mg/L	221
Tabla IV. 41.- Medida de la toxicidad durante el proceso de biodegradación para el tensioactivo Findet 1214N/23 a 20 mg/L	221
Tabla IV. 42.- Medida de la toxicidad durante el proceso de biodegradación para el tensioactivo Findet 1214N/23 a 25 mg/L	222
Tabla IV. 43.- Medida de la toxicidad durante el proceso de biodegradación para el tensioactivo Findet 1214N/23 a 50 mg/L	223
Tabla IV. 44.- Medida de la toxicidad durante el proceso de biodegradación para el tensioactivo NPEO a 5 mg/L	224
Tabla IV. 45.- Medida de la toxicidad durante el proceso de biodegradación para el tensioactivo NPEO a 25 mg/L	225
Tabla IV. 46.- Medida de la toxicidad durante el proceso de biodegradación para el tensioactivo NPEO a 50 mg/L	226
Tabla IV. 47.- Medida de la toxicidad durante el proceso de biodegradación para el tensioactivo GCP 215 a 12 mg/L	227

Tabla IV. 48.- Medida de la toxicidad durante el proceso de biodegradación para el tensioactivo GCP 600 a 100 mg/L	228
Tabla IV. 49.- Medida de la toxicidad durante el proceso de biodegradación para el tensioactivo GCP 650 a 20 mg/L	229
Tabla IV. 50.- Medida de la toxicidad durante el proceso de biodegradación para el LAS a 25 mg/L	230
Tabla IV. 51.- Medida de la toxicidad durante el proceso de biodegradación para el LAS a 50 mg/L	230
Tabla IV. 52.- Medida de la toxicidad durante el proceso de biodegradación para las mezclas tensioactivas Findet 1214N/23 y GCP 650	231
Tabla IV. 53.- Medida de la toxicidad durante el proceso de biodegradación para las mezclas tensioactivas Findet 1214N/23 y GCP 650	231

V. Discusión:

Tabla V. 1.- Parámetros del análisis de regresión	241
Tabla V. 2.- Valores de precisión obtenidos en el rango de valores de 0 a 2.5 mg/L	244
Tabla V. 3.- Parámetros de calidad de las rectas de calibración obtenidas por el método colorimétrico del reactivo yodo yoduro para distintos tipos de tensioactivos etoxilados	249
Tabla V. 4.- Porcentaje de recuperación de distintos tensioactivos no iónicos etoxilados	252
Tabla V. 5.- Porcentaje de recuperación para el Findet 1214N/23 sin destilar el acetato de etilo	253
Tabla V. 6.- Extracciones con acetato de etilo utilizando agua destilada	253
Tabla V. 7.- Comprobación de la interferencia del acetato de etilo en el proceso de extracción	254
Tabla V. 8.- Equivalencia entre AGE y NP 10 para el método de Wickbold potenciométrico	255
Tabla V. 9.- Parámetros de calidad para los tensioactivos etoxilados Findet 1214N/23 y Findet 10/15 por el método de Wickbold espectrofotométrico	256

Tabla V. 10.- Comparación de los parámetros de calidad para los tensioactivos Findet 1214N/23 y Findet 10/15 por el método de Wickbold y método del yodo yoduro..	257
Tabla V. 11.- Comparación de los métodos de análisis para tensioactivos no iónicos	258
Tabla V. 12.- Comprobación de la interferencia de APG en el método del yodo yoduro..	260
Tabla V. 13.- Medida de la cantidad de tensioactivo Findet 1214N/23 en presencia de cantidades variables de GCP 650	261
Tabla V. 14.- Nomenclatura de los AGE utilizados	264
Tabla V. 15.- Parámetros característicos de los perfiles de biodegradación para los AGE	274
Tabla V. 16.- Relación entre el HLB de los tensioactivos y sus aplicaciones.....	277
Tabla V. 17.- Parámetros característicos de las curvas de crecimiento de biomasa para AGE	288
Tabla V. 18.- Modelos propuestos por Schmidt y col. (Schmidt, 1985) para sustratos que no soportan el crecimiento de microorganismos sin considerar una concentración residual no biodegradable	293
Tabla V. 19.- Modelos de Schmidt y col. (Schmidt, 1985) adaptados a una conversión máxima (ó concentración de tensioactivo residual)	296
Tabla V. 20.- Parámetros cinéticos de la ecuación 5 del modelo que considera crecimiento exponencial para la biomasa y primer orden para el sustrato.....	299
Tabla V. 21.- Modelo cinético de Monod en función de la conversión	307
Tabla V. 22.- Parámetros cinéticos del modelo propuesto para los AGE	309
Tabla V. 23.- Comparación de los parámetros experimentales y los obtenidos de la aplicación del modelo propuesto para diferentes AGE	318
Tabla V. 24.- Modelo cinético de Andrews en función de la conversión	321
Tabla V. 25.- Parámetros cinéticos del modelo de Andrews para diferentes AGE a 50 mg/L	322
Tabla V. 26.- Parámetros característicos de los perfiles de biodegradación para el NPEO	324
Tabla V. 27.- Parámetros característicos de las curvas de crecimiento para el NPEO	325
Tabla V. 28.- Parámetros cinéticos del modelo propuesto (Ecuación V. 58) para el NPEO a diferentes concentraciones iniciales	330

Tabla V. 29.- Comparación entre los parámetros experimentales y los calculados según el modelo propuesto para el NPEO a diferentes concentraciones iniciales	332
Tabla V. 30.- Parámetros cinéticos del modelo de Andrews para el NPEO a 50 mg/L.....	333
Tabla V. 31.- Valores diarios de DQO, DBO ₅ , SS y pH del agua bruta y del agua tratada correspondientes al ensayo dinámico. Variación del oxígeno disuelto, T y concentración de sólidos (MLSS) del reactor	336
Tabla V. 32.- Diferentes métodos de ensayo para medir la biodegradabilidad de APG....	342
Tabla V. 33.- Equivalencia entre la concentración de los APG en mg/L y su concentración expresada como demanda teórica de oxígeno y en mg C/L. También se indica la concentración de oxígeno inicial en los ensayos.....	345
Tabla V. 34.- Parámetros obtenidos de las curvas de oxígeno disuelto	346
Tabla V. 35.- Parámetros característicos de las curvas de crecimiento para los APG.....	353
Tabla V. 36.- Equivalencia entre la concentración de los APG en mg/L y su concentración expresada como demanda teórica de oxígeno y en mg C/L para el ensayo respirométrico.....	355
Tabla V. 37.- Parámetros cinéticos característicos del proceso de biodegradación para los APG por el método respirométrico	361
Tabla V. 38.- Parámetros cinéticos característicos del proceso de biodegradación para el Findet 1618A/18 por el método respirométrico	363
Tabla V. 39.- Algunos resultados de biodegradación de LAS en ensayos con medio sintético y bajas concentraciones de inóculo (Perales, 2001)	364
Tabla V. 40.- Parámetros característicos de los perfiles de biodegradación para el LAS .	366
Tabla V. 41.- Parámetros característicos de las curvas de crecimiento para el LAS	367
Tabla V. 42.- Parámetros cinéticos para el LAS	369
Tabla V. 43.- Parámetros del modelo de Quiroga y col. para el LAS a diferentes concentraciones	372
Tabla V. 44.- Parámetros cinéticos del modelo logístico para el LAS a diferentes concentraciones iniciales.....	374

Tabla V. 45.- Parámetros cinéticos del modelo propuesto para el LAS a diferentes concentraciones iniciales	375
Tabla V. 46.- Comparación entre los parámetros experimentales y los calculados según el modelo propuesto para el LAS a diferentes concentraciones iniciales	378
Tabla V. 47.- Parámetros característicos de los perfiles de biodegradación para el Findet 1214N/23 en ausencia y en presencia de GCP 650	386
Tabla V. 48.- Parámetros característicos de las curvas de crecimiento para el Findet 1214N/23 en presencia y en ausencia de GCP 650	389
Tabla V. 49.- Parámetros característicos del modelo propuesto para el Findet 1214N/23 en presencia y en ausencia de GCP 650	392
Tabla V. 50.- Valores de EC_{20} y EC_{50} en mg/L para distintos tensioactivos.....	401

LISTA DE FIGURAS

II. Introducción:

Figura II. 1. Consumo total de tensioactivos en España en el período 1993-2003	26
Figura II. 2. Evolución del consumo de tensioactivos por tipos.....	27
Figura II. 3.- Estructura básica de un tensioactivo (Dorado, 1996).....	29
Figura II. 4.- Estructura molecular de los alcoholes grasos etoxilados	30
Figura II. 5.- Estructura molecular de los APEO	32
Figura II. 6.- Estructura de los Alquilpoliglucósidos	36
Figura II. 7.- Estructura molecular de los LAS	39
Figura II. 8.- Propiedades de los tensioactivos.....	41
Figura II. 9.- Principales empresas relacionadas con los tensioactivos.....	47
Figura II. 10.- Emisión de detergentes al medio ambiente.....	48
Figura II. 11.- Curva típica de biodegradación de un ensayo de biodegradación en discontinuo	71
Figura II. 12.- Evolución de la velocidad específica de crecimiento en función de la concentración de sustrato	76
Figura II. 13.- Modelos cinéticos en función de la concentración de sustrato y biomasa (Simkins, 1984)	81
Figura II. 14.- Curvas de biodegradación de compuestos de acuerdo con los modelos cinéticos mostrados en Tabla II. 11	83
Figura II. 15.- Representación gráfica de la Ecuación II. 20.....	85
Figura II. 16.- Mecanismo de biodegradación y metabolitos para la degradación aerobia de alcoholes grasos etoxilados	92
Figura II. 17.- Rutas de biodegradación del nonilfenol polietoxilado: (A) ruta hidrolítica oxidativa y (B) ruta hidrolítica no oxidativa	94
Figura II. 18.- Rutas de biodegradación de los alquilpoliglucósidos	96

Figura II. 19.- Esquema de la ruta de biodegradación aerobia del LAS 97

III. Materiales y Métodos:

Figura III. 1.- Protocolo de muestreo para el ensayo estático de biodegradación..... 130

Figura III. 2.- Equipo utilizado en el Ensayo Dinámico de Biodegradación 134

Figura III. 3.- Equipo para extracción y concentración en corriente gaseosa 136

Figura III. 4.- Protocolo de muestreo para el ensayo dinámico de biodegradación..... 139

Figura III. 5.- Perfil típico de biodegradación para el ensayo dinámico de biodegradación
..... 141

Figura III. 6.- Representación esquemática del equipo respirométrico..... 143

Figura III. 7.- Curva de DBO obtenida por técnica respirométrica para el tensioactivo GCP
215 a 100 mg/L 145

Figura III. 8.- Recta de calibrado para el método de análisis simplificado para la
determinación de sustancias activas al azul de metileno..... 148

Figura III. 9.- Curva de valoración potenciométrica para el reactivo de Dragendorff..... 153

Figura III. 10.- Recta de calibrado por el método espectrofotométrico para el reactivo de
Dragendorff..... 155

Figura III. 11.- Recta de calibrado por el método colorimétrico del yodo-yoduro 157

Figura III. 12.- Recta de calibrado por el método del carbono orgánico total 159

Figura III. 13.- Esquema de una cubeta para determinación del TOC..... 160

Figura III. 14.- Representación esquemática del método de determinación del TOC 161

Figura III. 15.- Evolución de la concentración residual en función del tiempo para el
tensioactivo GCP 600 a una concentración inicial de 12 mg/L utilizando el método del
TOC..... 162

Figura III. 16.- Recta de calibrado para la DQO 169

Figura III. 17.- Relación lineal entre la función Γ y la concentración para el tensioactivo
Findet 1214N/23..... 176

V. Discusión:

Figura V. 1.- Reacción de formación del par iónico tensioactivo aniónico-azul de metileno	236
Figura V. 2.- Procedimiento analítico normalizado para la determinación de tensioactivos aniónicos	237
Figura V. 3.- Procedimiento analítico simplificado para la determinación de tensioactivos aniónicos	240
Figura V. 4.- Recta de calibrado obtenida para el LAS utilizando el método simplificado de las sustancias activas al azul de metileno	241
Figura V. 5.- Gráfico de residuales	242
Figura V. 6.- Procedimiento analítico para el método colorimétrico del yodo-yoduro para la determinación de tensioactivos no iónicos	247
Figura V. 7.- Rectas de calibrado obtenidas para los distintos tensioactivos no iónicos etoxilados utilizando el método colorimétrico del yodo-yoduro	248
Figura V. 8.- Variación de la sensibilidad analítica y el límite de detección con el número de moles de OE presentes en los tensioactivos no iónicos etoxilados	250
Figura V. 9.- Rectas de calibrado obtenidas para los Findet 1214N/23 y Findet 10/15 en el rango de 200 a 1000 µg por el método de Wickbold espectrofotométrico	256
Figura V. 10.- Comparación de curvas de biodegradación para diferentes AGE utilizando el método de Wickbold y el método del yodo-yoduro	259
Figura V. 11.- Efecto de la cantidad de Glucopón 650 adicionado sobre la cantidad de Findet 1214N/23 medida (derecha). Los valores de cantidad de Findet 1214N/23 medida se obtuvieron por comparación de las absorbancias con su recta patrón correspondiente (izquierda)	261
Figura V. 12.- Medida de la cantidad de tensioactivos no iónicos en el BEROL por el método de Wickbold espectrofotométrico y de las adiciones patrón	263
Figura V. 13.- Variación de la concentración de tensioactivo residual y del porcentaje de biodegradación con el tiempo para los AGE ensayados a 5 mg/L	266

Figura V. 14.- Influencia del grado de etoxilación y el tamaño de la cadena carbonada sobre la biodegradación primaria para los AGE ensayados a la concentración inicial de 5 mg/L	267
Figura V. 15.- Influencia del grado de etoxilación y el tamaño de la cadena carbonada sobre la biodegradación primaria para los AGE ensayados a la concentración inicial de 25 mg/L	269
Figura V. 16.- Influencia del grado de etoxilación y el tamaño de la cadena carbonada sobre la biodegradación primaria para los AGE ensayados a la concentración inicial de 50 mg/L	269
Figura V. 17.- Influencia de la concentración de tensioactivo durante el proceso de biodegradación: evolución del porcentaje de tensioactivo residual y el porcentaje de biodegradación en función del tiempo para diferentes AGE	271
Figura V. 18.- Determinación gráfica del tiempo de latencia sobre la curva de biodegradación	273
Figura V. 19.- Efecto de la concentración sobre el tiempo de latencia para diferentes AGE	275
Figura V. 20.- Variación de la velocidad media de biodegradación frente al número de moles de OE a diferentes concentraciones iniciales.....	276
Figura V. 21.- Mecanismo simplificado de biodegradación de alcoholes grasos etoxilados	276
Figura V. 22.- Biodegradabilidad de los AGE frente al HLB a diferentes concentraciones iniciales.....	278
Figura V. 23.- Variación de los parámetros característicos de los perfiles de biodegradación para los AGE con la concentración inicial de materia tensioactiva	279
Figura V. 24.- Evolución del número de UFC/ml durante los ensayos de biodegradación para los tensioactivos AGE estudiados a diferentes concentraciones iniciales.....	282
Figura V. 25.- Influencia del grado de etoxilación y el tamaño de la cadena carbonada sobre las curvas de crecimiento de biomasa para diferentes AGE ensayados a la concentraciones iniciales de 5, 25 y 50 mg/L	283
Figura V. 26.- Curvas de crecimiento y perfiles de biodegradación para el tensioactivo C ₁₂ - ₁₄ E ₄ a 5, 25 y 50 mg/L.....	284

Figura V. 27.- Curvas de crecimiento y perfiles de biodegradación primaria para el tensioactivo C ₁₂₋₁₄ E ₁₁ a 15, 20 y 50 mg/L	285
Figura V. 28.- Curvas de crecimiento y perfiles de biodegradación primaria para el tensioactivo C ₁₆₋₁₈ E ₆ a 5 y 25 mg/L.....	286
Figura V. 29.- Curva de crecimiento y perfil de biodegradación primaria para el tensioactivo C ₁₆₋₁₈ E ₁₁ a 5 mg/L	286
Figura V. 30.- Variación de la velocidad específica de crecimiento con la concentración inicial de ensayo para los AGE C ₁₂₋₁₄ E ₄ y C ₁₂₋₁₄ E ₁₁	288
Figura V. 31.- Comparación entre los resultados experimentales y los obtenidos aplicando la ecuación 5 del modelo que considera crecimiento exponencial para la biomasa y primer orden para el sustrato	298
Figura V. 32.- Comparación entre los resultados experimentales y calculados del crecimiento de microorganismos para diferentes AGE.....	301
Figura V. 33.- Aplicación de las diferentes ecuaciones del modelo de Monod para los tensioactivos C ₁₂₋₁₄ E ₁₁ y C ₁₆₋₁₈ E ₁₁	308
Figura V. 34.- Representación de β_s frente a la concentración inicial de tensioactivo para C ₁₂₋₁₄ E ₁₁	310
Figura V. 35.- Comparación entre los resultados experimentales y los obtenidos aplicando el modelo propuesto para el tensioactivo C ₁₂₋₁₄ E ₁₁ a diferentes concentraciones iniciales.....	311
Figura V. 36.- Comparación entre los resultados experimentales y los obtenidos aplicando el modelo propuesto para el tensioactivo C ₁₆₋₁₈ E ₆ a diferentes concentraciones iniciales.....	312
Figura V. 37.- Comparación entre los resultados experimentales y los obtenidos aplicando el modelo propuesto para el tensioactivo C ₁₂₋₁₄ E ₄ a diferentes concentraciones iniciales.....	313
Figura V. 38.- Comparación entre los resultados experimentales y los obtenidos aplicando el modelo propuesto para los tensioactivos C ₁₆₋₁₈ E ₁₁ , C ₁₀ E ₆ y C ₁₀ E ₃	314
Figura V. 39.- Comparación entre los valores de conversión experimentales y calculados según el modelo de Monod para los AGE a diferentes concentraciones.....	315

Figura V. 40.- Evolución del porcentaje de NPEO residual en los ensayos de biodegradación para diferentes concentraciones de materia tensioactiva	324
Figura V. 41.- Curvas de crecimiento de microorganismos y perfiles de biodegradación primaria para el NPEO a diferentes concentraciones iniciales de ensayo.....	326
Figura V. 42.- Comparación entre los resultados experimentales y calculados del crecimiento de microorganismos el NPEO a diferentes concentraciones iniciales ...	329
Figura V. 43.- Comparación entre los resultados experimentales y los obtenidos aplicando el modelo propuesto para el NPEO a diferentes concentraciones iniciales	331
Figura V. 44.- Comparación entre los valores de conversión experimentales y calculados según el modelo propuesto para el NPEO a diferentes concentraciones	332
Figura V. 45.- Evolución de la concentración de tensioactivo y del porcentaje de biodegradación en el ensayo dinámico.....	338
Figura V. 46.- Evolución de la DBO y DQO con el tiempo para el tensioactivo Findet 1214N/23 durante el ensayo dinámico	339
Figura V. 47.- Evolución de los sólidos en suspensión y el oxígeno disuelto con el tiempo para los tensioactivos Findet 1214N/23 y Findet 1618A/18 durante el ensayo dinámico	340
Figura V. 48.- Curvas de degradación para los APG mediante el método de la botella cerrada	344
Figura V. 49.- Evolución del número de UFC/ml durante los ensayos de biodegradación para los APG estudiados a diferentes concentraciones iniciales.....	348
Figura V. 50.- Curvas de crecimiento de biomasa para los diferentes APG ensayados a la concentración inicial de 12 mg/L	349
Figura V. 51.- Curvas de crecimiento de microorganismos y curvas de oxígeno disuelto para los APG ensayados a diferentes concentraciones iniciales	350
Figura V. 52.- Comprobación de la hipótesis de Gaden para los APG.....	352
Figura V. 53.- Curvas de DBO y biodegradabilidad última por el método respirométrico para el GCP 215 y el GCP 650.....	354
Figura V. 54.- Curvas de DBO y biodegradabilidad última por el método respirométrico para diferentes APG a 50 mg/L.....	355

Figura V. 55.- Curva típica de consumo de oxígeno. Determinación de los parámetros cinéticos de acuerdo con Blok y col. (Blok, 1996).....	356
Figura V. 56.- Representación de \ln DBO frente al tiempo para la obtención de K_{min}	357
Figura V. 57.- Representación de DBO frente al tiempo para la obtención de K_S	358
Figura V. 58.- Obtención de t_m a partir de la curva de mineralización	359
Figura V. 59.- Localización del punto de inflexión para la obtención de K_S	360
Figura V. 60.- Representación de μ frente a la concentración de sustrato para el GCP 215 y el GCP 600	361
Figura V. 61.- Curvas de DBO y biodegradabilidad última por el método respirométrico para el Findet 1618A/18	363
Figura V. 62.- Perfiles de biodegradación del LAS a 5, 25 y 50 mg/L.....	366
Figura V. 63.- Curvas de crecimiento de microorganismos y perfiles de biodegradación primaria para el LAS a diferentes concentraciones iniciales de ensayo.....	368
Figura V. 64.- Comparación entre los resultados experimentales y los calculados por diferentes modelos para el LAS a las concentraciones de 5, 25 y 50 mg/L respectivamente	371
Figura V. 65.- Comparación entre los resultados experimentales y los obtenidos aplicando el modelo logístico para el LAS a diferentes concentraciones iniciales.....	374
Figura V. 66.- Comprobación de la hipótesis de Gaden para el LAS a 50 mg/L.....	376
Figura V. 67.- Representación de β_S frente a la concentración inicial de tensioactivo	377
Figura V. 68.- Comparación entre los resultados experimentales y los obtenidos aplicando el modelo propuesto para el LAS a diferentes concentraciones iniciales.....	377
Figura V. 69.- Comparación entre los valores de conversión experimentales y calculados según el modelo propuesto para el LAS a las concentraciones de 5, 25 y 50 mg/L ..	379
Figura V. 70.- Comparación de t_L y B para los diferentes tensioactivos ensayados	380
Figura V. 71.- Comparación de k , Y_{ap} y UFC/ml_{max} para los diferentes tensioactivos ensayados.....	381
Figura V. 72.- Comparación de μ_m y K_S para los diferentes tensioactivos ensayados.....	382

Figura V. 73.- Variación de la concentración residual de Findet 1214N/23 en ausencia y en presencia de GCP 650	385
Figura V. 74.- Curvas de crecimiento de microorganismos para las mezclas Findet 1214N/23 y GCP 650	387
Figura V. 75.- Curvas de crecimiento de microorganismos para el Findet 1214N/23 en ausencia y en presencia de GCP 650.....	388
Figura V. 76.- Comparación entre el perfil de biodegradación y las curvas de crecimiento de microorganismos para las mezclas tensioactivas	390
Figura V. 77.- Comparación entre los resultados experimentales y los obtenidos aplicando el modelo propuesto para las mezclas de AGE y APG	391
Figura V. 78.- Efecto observado para los parámetros característicos y cinéticos correspondientes al ensayo de biodegradación de 15 mg/L de Findet 1214N/23 en presencia de 5 mg/L de GCP 650.....	393
Figura V. 79.- Linealización entre la función gamma y la concentración para diferentes tensioactivos	396
Figura V. 80.- Valores de EC ₂₀ y EC ₅₀ en mg/L para distintos tensioactivos	401
Figura V. 81.- Variación de la EC ₅₀ (15 min) de los AGE con diferentes propiedades del tensioactivo.....	403
Figura V. 82.- Variación del tanto por ciento de inhibición durante el proceso de biodegradación para todos los tensioactivos ensayados.....	407
Figura V. 83.- Evolución de la toxicidad durante el proceso de biodegradación para diferentes tensioactivos	411

NOMENCLATURA

A	Absorbancia
ABS	Alquilbenceno Sulfonato
AE	Alcohol etoxilado
AFNOR	Asociación francesa de normalización
AGE	Alcohol graso etoxilado
APG	Tensioactivos del tipo alquilpoliglucósidos
APnEO_s	Alquilfenoles polietoxilados
AS	Tensioactivo aniónico
BIAS	Sustancias activas frente al bismuto
BOE	Boletín Oficial del Estado
BOJA	Boletín Oficial de la Junta de Andalucía
c	Concentración
CEE	Comunidad Económica Europea
CM	Carga másica
CMC	Concentración micelar crítica
CO₂	Dióxido de carbono
COD	Carbono orgánico disuelto
Conc.	Concentración
CP	Punto de enturbiamiento del tensioactivo
CTAS	Sustancias activas al tiocinato de cobalto
DBO	Demanda biológica de oxígeno
DL	Límite de detección
DOCE	Diario oficial de las comunidades europeas
DO_T	Demanda teórica de oxígeno

DP	Grado de polimerización en la molécula del tensioactivo
DQO	Demanda química de oxígeno
EC₂₀	Concentración que provoca efecto sobre el 20% de la población ensayada
EC₅₀	Concentración que provoca efecto sobre el 50% de la población ensayada
EDAR	Estación depuradora de aguas residuales
EDTA	Ácido etilén diamino tetraacético
EMPA	Laboratorios Federales Suizos para el Ensayo e Investigación de Materiales
F10/15	Findet 10/15
F10/18	Findet 10/18
F1214N/16	Findet 1214N/16
F1214N/23	Findet 1214N/23
F1618A/18	Findet 1618A/18
F1618A/23	Findet 1618A/23
FAEO	Alcoholes grasos etoxilados
FAES	Sulfatos éteres de alcoholes grasos
FAR/52	Findet AR/52
FAS	Sulfatos de alcoholes grasos
GC	Cromatografía gaseosa
GCP215	Tensioactivo comercial Glucopon 215
GCP600	Tensioactivo comercial Glucopon 600
GCP650	Tensioactivo comercial Glucopon 650
HLB	Balance hidrófilo-lipófilo del tensioactivo
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IC₅₀	Concentración que provoca efecto sobre el 50% de la población ensayada de <i>Daphnia Magna</i>
INE	Instituto nacional de estadística

ISO	Organización internacional para la estandarización
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LAB	Lineal Alquilbenceno
LAS	Lineal Alquilbenceno sulfonatos
LC₅₀	Concentración que provoca mortalidad sobre el 50% de la población ensayada
LESS	Lauril eter sulfato sódico
LOF	test de lack of fit
MB	Azul de metileno
MBAS	Sustancias activas al azul de metileno
MITI	Ministerio de Comercio Internacional e Industria de Japón
MLSS	Concentración de sólidos en suspensión
N_C	Tamaño de la cadena carbonada
NP	Nonilfenol
NP₁EO	Nonilfenol monoetoxilado
NP₂EO	Nonilfenol dietoxilado
NPEO	Nonilfenol polietoxilado
NP_nEC	Nonilfenol carboxilado
NP_nEO	Nonilfenol polietoxilado
NTA	Nitriloacetato sódico
O/W	Emulsión aceite en agua
OCDE	Organización para la cooperación y desarrollo económico
OE	Número de unidades de óxido de etileno en la molécula del tensioactivo
OLS	Ajuste lineal por mínimos cuadrados ordinario
OPEO	Octilfenol polietoxilado
P.A.	Calidad del reactivo “para análisis”

P.A.I.	Calidad del reactivo “para análisis instrumental”
P.R.S.	Calidad de reactivo “purísimo”
PEC	Concentración de un compuesto en el medio ambiente
PM	Peso molecular del producto
Q.P.	Calidad del reactivo “químicamente puro”
QL	Límite de cuantificación
R	Grupo alquílico
r	Coefficiente de correlación
r.p.m.	Número de revoluciones por minuto
R²	Coefficiente de determinación
RBT	Ensayos del tipo “Ready Biodegradability Test”
Residual	Diferencia entre el valor observado y el valor predicho por el modelo de regresión para la variable respuesta
S.S.	Sólidos en suspensión
SAAM	Sustancias activas al azul de metileno
SCAS	Lodos activados en semicontínuo
SDR	Desviación estándar relativa
SDS	Sodio dodecilsulfato
t	Tiempo
TBS	Tetrapropilén benceno sulfonato sódico
TIC	Carbono inorgánico total
TLC	Cromatografía de capa fina
TOC	Carbono orgánico total
TU	Unidades de toxicidad
U	Potencial
UFC	Unidades formadoras de colonias

UNE	Una Norma Española
V	volumen
W/O	Emulsión agua en aceite
x	Conversión de sustrato

