

## **Aplicación del método zahn-wellens para determinar biodegradabilidad de un producto antiderrames**

Application of zahn-wellens method to determine biodegradability of an anti-spill product

Dr. C Miguel A. Díaz-Díaz<sup>1\*</sup> <https://orcid.org/0000-0002-0633-3477>

MSc. Lester Rivas-Trasancos<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0001-9521-4420>

Lic. Jeniffer Martínez-González<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0001-7540-9415>

Téc. Raisa Teuteló-Núñez<sup>1</sup>

Téc. Daylén Salazar-Alemán<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigación del Petróleo, La Habana, Cuba

\*Autor para la correspondencia. correo electrónico: michael@ceinpet.cupet.cu

### **RESUMEN**

En este trabajo se determina la biodegradabilidad de un producto comercial utilizado para el control de derrames de hidrocarburos. Mediante la aplicación del método Zahn-Wellens se evaluó la biodegradabilidad primaria y final en medio acuoso, así como su eliminación total por microorganismos aeróbicos. La cinética de biodegradación se siguió mediante el método standard ISO de dicromato para Demanda Química de Oxígeno (DQO) en un sistema acuoso estático, que contiene una cantidad determinada del compuesto. Se preparó una disolución de un compuesto de referencia biodegradable y un blanco con medio de prueba e inóculo. La remoción se incrementó notablemente hasta los 14 días, igual comportamiento observado para el compuesto de referencia. El producto evaluado puede ser considerado biodegradable, de acuerdo a la remoción de DQO obtenida en el tiempo. La cinética de biodegradación sigue el comportamiento de una ecuación polinómica de segundo orden, la cual alcanzó un 94,5% de remoción de DQO.

**Palabras clave:** cinética de biodegradación; demanda química de oxígeno; derrames; remoción.

## ABSTRACT

The aim of this study was to determine the biodegradability of a product to control oil spill. It was evaluated the primary and final biodegradability of an anti-spill product in aqueous medium, also the total elimination by aerobic microorganisms. The kinetic of biodegradation followed by ISO standard method of dichromate to Chemical Oxygen Demand (COD), in an aqueous static system containing a selected quantity of the compound. It was prepared a biodegradable reference compound solution and a blank with test medium and inoculum. The removal increased until 14 days, same to the reference compound. The evaluated product can be considered biodegradable, according to the COD removal at the time. The kinetic of biodegradation followed a polynomial equation of second order, and reached a 94.5% COD removal.

**Keywords:** biodegradation kinetic; chemical oxygen demand; spills; removal.

Recibido: 20/11/2019

Aprobado: 30/4/2020

## Introducción

La biodegradación es un proceso en el cual los microorganismos naturales (levaduras, hongos o bacterias) descomponen o degradan sustancias peligrosas, transformándolas en sustancias menos tóxicas o inocuas. Los microorganismos, igual que los seres humanos, comen y digieren sustancias orgánicas, de las cuales se nutren y obtienen energía.<sup>(1-4)</sup> En términos químicos, los compuestos "orgánicos" son aquellos que contienen átomos de carbono y de hidrógeno. Ciertos microorganismos pueden digerir sustancias orgánicas, como combustibles o solventes, que son peligrosas para los seres humanos.<sup>(5-6)</sup> La biodegradación puede producirse en presencia de oxígeno (en condiciones aerobias) o sin él (en condiciones anaerobias).<sup>(6)</sup>

Los productos biodegradables son aquellos obtenidos con materiales totalmente naturales o sintéticos, no contaminantes, que pueden ser destruidos por los microorganismos. El sol, la lluvia, el viento y la humedad, entre otros factores, los descomponen de forma natural. Se degradan sin ningún proceso humano, evitando así dejar residuos tóxicos en la naturaleza. Estos también pueden descomponerse por la acción de agentes biológicos, bajo condiciones ambientales naturales. Al degradarse, evitan su permanencia durante años en la naturaleza, hasta su absoluta desaparición orgánica.<sup>(7-8)</sup>

Los resultados obtenidos durante la determinación de Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO) en agua son el producto de la combinación de reacciones químicas y bioquímicas. Ellas no tienen el rigor y carácter ambiguo de aquellos resultados de un proceso químico simple y bien definido.<sup>(9-10)</sup> A pesar de ello, suministran una indicación de la cual puede estimarse la calidad de las aguas.<sup>(11)</sup> El ensayo puede ser influenciado por la presencia de varias sustancias. Aquellas que son tóxicas a los microorganismos, como bactericidas, metales tóxicos o cloro libre, pueden inhibir la oxidación bioquímica. La presencia de algas o microorganismos nitrificantes pueden

producir resultados elevados.

La DQO en agua cuando se determina por el método del dicromato puede considerarse como una medición aproximada de la demanda teórica de oxígeno, o sea, la cantidad de oxígeno consumida en una oxidación química total de los constituyentes orgánicos hasta productos finales inorgánicos.<sup>(12)</sup> El grado en el cual los resultados de los ensayos se aproximen al valor teórico depende primeramente de cuan completa sea la oxidación. Un gran número de componentes orgánicos se oxidan hasta una extensión entre el 90 y el 100 % y para aguas donde estos compuestos predominen, el valor de la DQO es una medida real de la Demanda Teórica de Oxígeno.

La prueba de Zahn-Wellens es un ensayo clásico para determinar la biodegradabilidad inherente (posible en principio) de sustancias orgánicas no volátiles solubles en agua.<sup>(7,12)</sup> La sustancia de prueba se incuba en un medio mineral con cantidades relativas de lodo activado como inóculo durante 28 días y se sigue el decrecimiento de la concentración de materia orgánica a intervalos regulares de tiempo. Esta prueba no ha sido reportada anteriormente para estudios de biodegradabilidad de productos comerciales utilizados para el control de derrames de hidrocarburos.

Para el control de derrames de hidrocarburos se emplea una amplia variedad de productos, tales como los alcoholes grasos etoxilados, que por sus propiedades humectantes y emulsificantes son útiles como dispersantes, solubilizantes y agentes acoplantes, los cuales se consideran completamente biodegradables.<sup>(13)</sup>

Los alcoholes grasos etoxilados, éteres de poliglicol de alcoholes grasos o polialquilenglicoléteres, con una estrecha distribución de homólogos, también conocidos como etoxilados de rango estrecho, son tensioactivos no iónicos conocidos, que se producen industrialmente.

Una gran variedad de productos comerciales que se ofertan para combatir derrames petrolíferos incluyen en su composición estos compuestos, pero se carece de estudios que demuestren su biodegradabilidad y establezcan que su empleo no va a originar un impacto secundario al ecosistema, cuando sea necesario su uso en emergencias de este tipo.

El objetivo de este trabajo ha sido la aplicación del método Zahn-Wellens para determinar la biodegradabilidad del producto comercial OSCK para el control de derrames de hidrocarburos, con vistas a definir que su empleo no va a originar un impacto secundario al ecosistema.

## **Materiales y métodos**

Las pruebas de biodegradabilidad del producto comercial OSCK se realizaron según la norma ISO 9888:1999 (confirmado en el 2015), que especifica un método para la evaluación en medio acuoso de la biodegradabilidad primaria y final, así como la eliminación total del agua de compuestos orgánicos a una concentración dada mediante microorganismos aeróbicos.<sup>(12)</sup>

La cinética de biodegradación del producto se siguió mediante la determinación de la demanda química de oxígeno (DQO), desde tiempo cero hasta 28 días (valor normal recomendado por el método normalizado), tomando muestras a intervalos regulares de tiempo, en un sistema acuoso estático, conteniendo una cantidad seleccionada del compuesto a evaluar para obtener una

concentración inicial de 500 – 1000 mg/L DQO. El estudio cinético se desarrolla para una reacción de segundo orden, cuya velocidad es proporcional al cuadrado de la concentración de una sola variable,  $r = k_2 * [A]^2$ , en este caso la concentración de DQO.

Simultáneamente se preparó una disolución de etilenglicol, un compuesto de referencia reconocido como biodegradable, la cual se utilizó con una concentración inicial de 1000 – 1300 mg/L DQO y un blanco que contiene el medio de prueba (nutrientes) e inóculo (se utilizó lodo seco de una planta de tratamiento de residuales domésticos).<sup>(12)</sup> Los experimentos se realizaron por triplicado, con incubación durante el período de prueba a temperatura  $20 \pm 1$  °C en incubadora refrigerada marca Memmert ICP 260 de fabricación alemana. En los análisis se empleó el método standard establecido para determinar DQO (ISO 6060:1989 confirmado en el 2017).<sup>(9)</sup>

En la tabla 1 se muestra el diseño de ensayos aplicado para las pruebas de biodegradabilidad, donde FT representa al producto a evaluar, FR al compuesto de referencia y BR al blanco de medio de prueba.

**Tabla 1** - Diseño de ensayos aplicado para las pruebas de biodegradabilidad.

Recipiente	Medio de prueba	Compuesto de prueba	Compuesto de referencia	Inóculo
Compuesto de prueba FT	+	+	-	+
Compuesto de referencia FR	+	-	+	+
Blanco medio de prueba BR	+	-	-	+

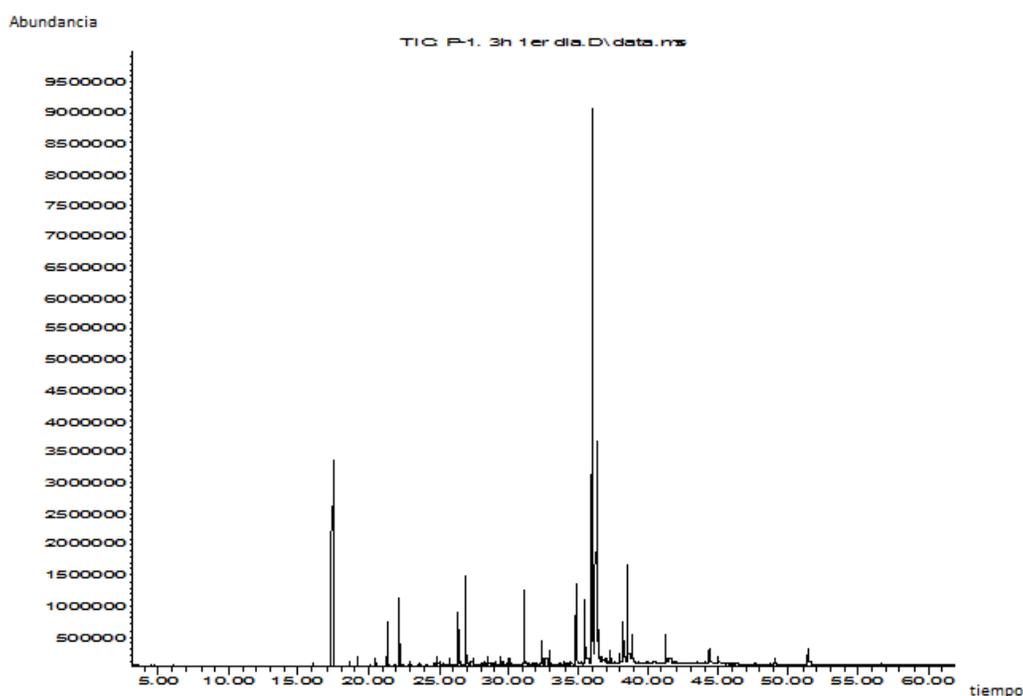
(+) componentes incorporados en cada recipiente.

Para identificar los compuestos presentes en su composición, se tomaron muestras del producto comercial OSCK y después de sometido a un proceso de biodegradación por un período de incubación de 7 días, para ser extraídas con n-hexano (grado cromatográfico), concentradas y purificados los extractos orgánicos mediante el uso de cromatografía de absorción en columnas con florisil, según norma UNE-EN ISO 9377-2,<sup>(14)</sup> después de lo cual fueron analizadas cualitativamente por la técnica de cromatografía de gases con detector másico (CG-EM) (EPA 8270).<sup>(15)</sup>

La cromatografía de gases se realizó en un cromatógrafo Agilent 7890A de fabricación USA con detector de espectrometría de masas 5975C (Agilent), sistema de cómputo y una columna capilar DB-5 (30 m x 250  $\mu$ m d.i y 0,25  $\mu$ m de espesor de película, Agilent), y helio como gas portador. El modo de ionización fue por impacto electrónico, con una energía de 70 eV. Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: temperatura del inyector: 300 °C, temperatura de interfase MS: 280°C y el programa de temperatura utilizado de 60°C durante 2 min, se incrementó a 300°C con una rampa de temperatura de 6 °C/ min y se mantuvo isotérmico a esta temperatura por 20 min. La inyección de 1 $\mu$ L del extracto orgánico de la muestra se realizó con un auto inyector Agilent modelo G4513A en modo splitless durante 45 segundos. Para el procesamiento de la muestra se utilizó software MSD Productivity ChemStation, versión E.02.02. Para la identificación de los compuestos se utilizaron los espectros de masas, los tiempos de retención obtenidos mediante cromatografía de gases y se compararon con los datos de la biblioteca de espectros del programa AMDIS32.

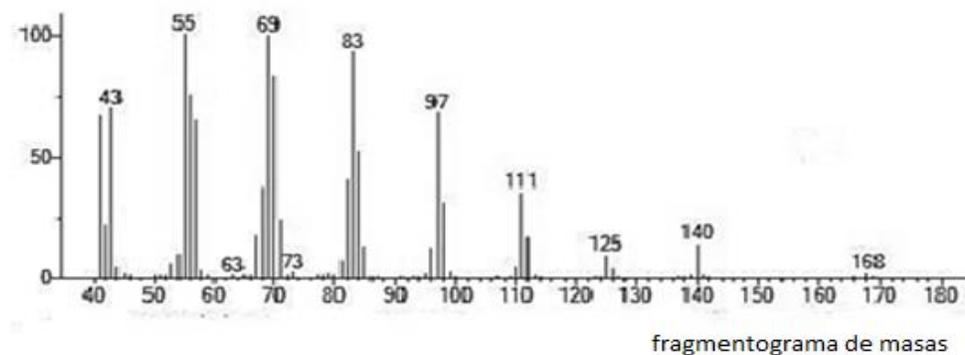
## Resultados y discusión

Mediante la aplicación de la cromatografía gaseosa acoplada con espectrometría de masas (CG-EM), técnica muy eficiente para identificar picos con facilidad y exactitud, se pudo establecer la composición elemental del producto OSCK, la cual no aparece reportada en otros estudios. En la figura 1 se muestra el cromatograma obtenido para el producto comercial, donde se identificaron los picos de los compuestos 1-dodecanol, ácido dodecanoico, 1-tetradecanol, 1-hexadecanol y ácido hexadecanoico, como los de mayor abundancia. Los alcoholes grasos etoxilados son surfactantes no iónicos que contienen una porción hidrofóbica (parte de alcohol graso) y grupos polares hidrofílicos (parte de cadena etoxi), de ahí la tendencia a disolverse en fase acuosa y aceitosa, y reducir la tensión superficial de los líquidos.<sup>(16-17)</sup> En su composición se identificaron también una familia de polialquilenglicoléteres, en este caso, éteres monodecil etilenglicoles. La presencia de una familia de polioxialcoholes en el producto permite suponer que debe tener características biodegradables adecuadas para su uso en caso de un derrame petrolífero, dada la biodegradabilidad reportada para estos tensioactivos no iónicos.<sup>(18)</sup>

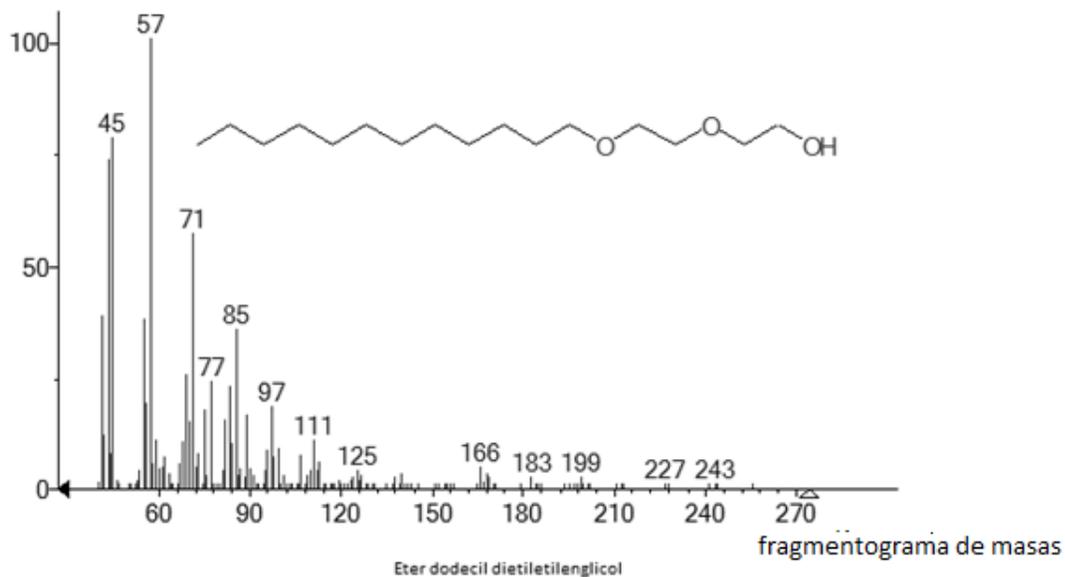


**Fig. 1** - Cromatograma del producto comercial OSCK

La figura 2 nos muestra el espectro de masas del 1-dodecanol identificado en el producto, el cual aparece con un 94% de pureza. En la figura 3 se puede apreciar el espectro de masas de uno de los éteres monodecil etilenglicoles identificados, en este caso el dodecil dietilenglicol. De forma similar se obtuvo los espectros de masas para todos los compuestos identificados con mayor abundancia.



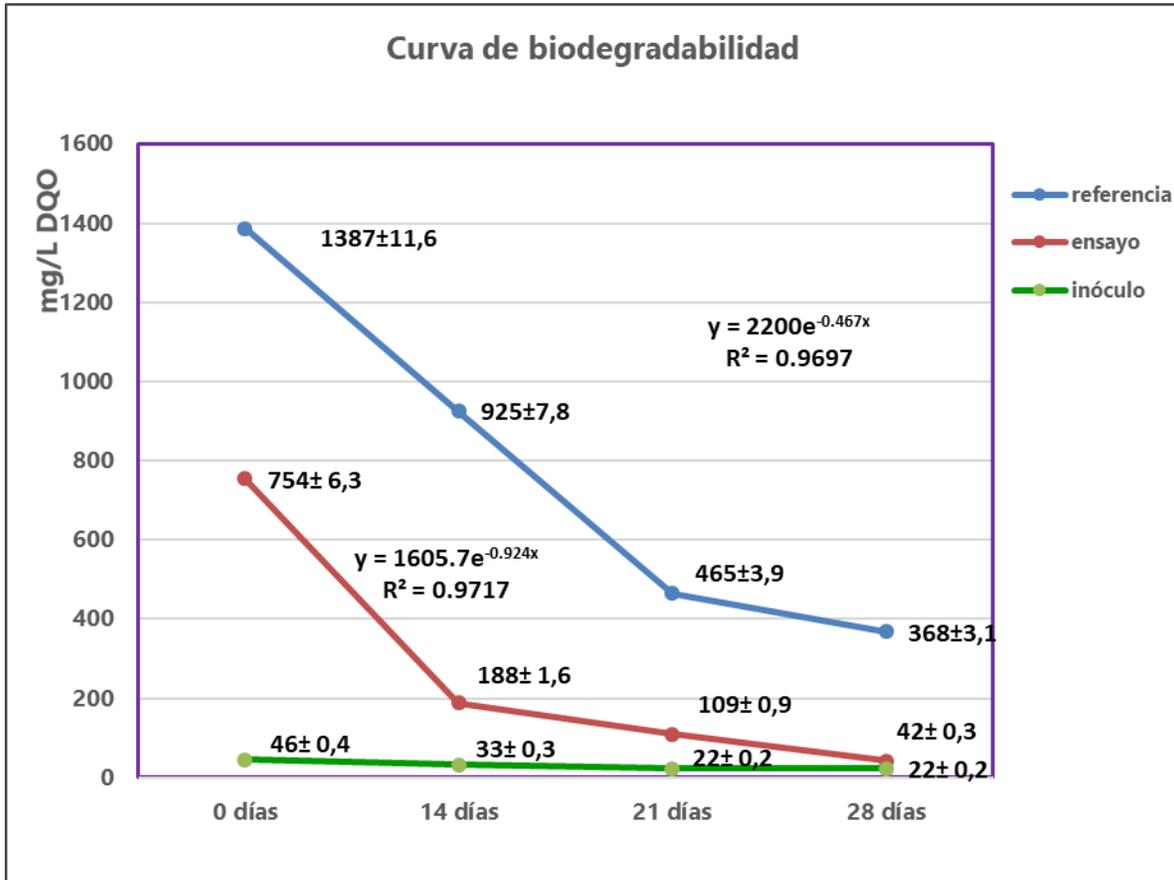
**Fig. 2** - Espectro de masas del 1-dodecanol identificado en el producto



**Fig. 3** - Espectro de masas del éter dodecil dietilenglicol

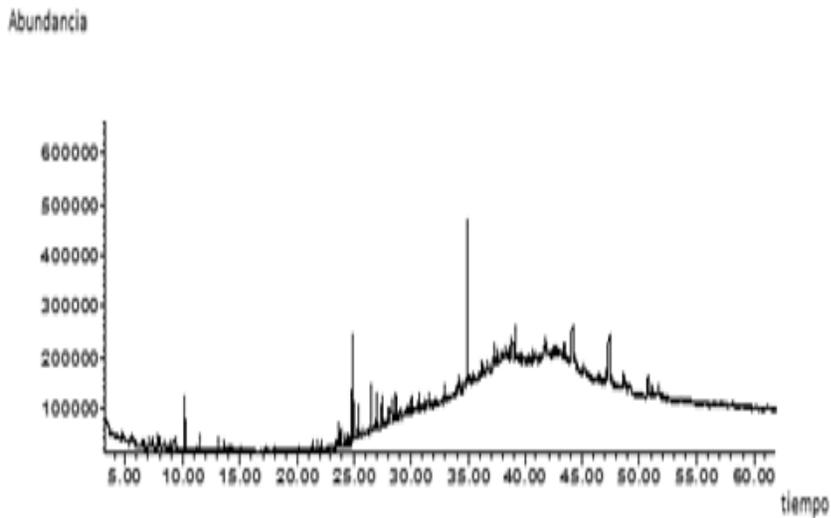
En la figura 4 aparecen los resultados promedios de concentración de DQO (expresados en mg/L) en las pruebas de biodegradabilidad y su comportamiento en el tiempo. Se aprecia una disminución sensible en los valores obtenidos en los primeros 14 días, lo que denota que es un producto biodegradable. Se reporta la incertidumbre expandida con nivel de confiabilidad de 95%.<sup>(19)</sup>

Como se puede observar en la figura 4, los niveles de concentración de DQO en la muestra con el producto evaluado disminuyeron en el tiempo de forma exponencial, similar al comportamiento obtenido para el compuesto de referencia. Esto es de suma importancia para definir que su empleo no va a originar un impacto secundario al ecosistema y aprobar su uso en emergencias de derrames petrolíferos.

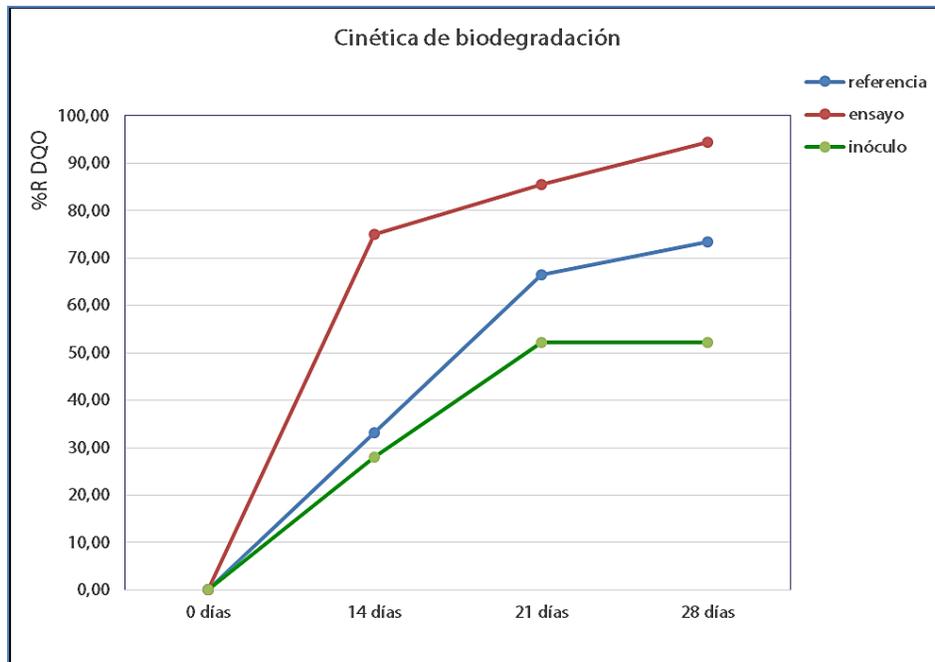


**Fig. 4** - Pruebas de biodegradabilidad, concentraciones expresadas en mg/L DQO

En la figura 5 se muestra el cromatograma obtenido para el producto OSCK después de un proceso de biodegradación de 7 días, donde se identificaron sólo los picos de los compuestos 1-dodecanol y 1-hexadecanol, como los de mayor abundancia de los compuestos que aparecen en el producto comercial, aunque en una cantidad muy inferior a la detectada en el producto. Se debe señalar que los picos de los polialquilenglicoléteres desaparecieron, lo que denota la biodegradabilidad de estos componentes del producto.



**Fig. 5** - Cromatograma del producto OSCK después de un proceso de biodegradación de 7 días



**Fig. 6** - Cinética de biodegradación, remoción de DQO en %.

En la cinética de biodegradación obtenida en un periodo de 28 días (figura 6), se aprecia que el porcentaje de remoción se incrementa notablemente hasta los 14 días en el caso del producto de ensayo y después refleja una menor variación. Este comportamiento es similar al observado

para el compuesto de referencia, aunque para este se obtuvo la mayor remoción de DQO a los 21 días, lo que está dado porque la prueba se realiza de modo discontinuo y la elevada concentración utilizada del compuesto de referencia puede resultar tóxica para los microorganismos.<sup>(20)</sup>

Para la remoción de DQO en la muestra con el producto evaluado se obtuvo una ecuación polinómica que sigue una cinética de segundo orden, debido a la rapidez con que se modifica la concentración del producto al transcurrir el tiempo por la oxidación de la materia orgánica, la cual se muestra a continuación.

$$y = -16,522x^2 + 112,01x - 92,335 \quad (R^2 = 0,9646) \quad (1)$$

## Conclusiones

La aplicación del método Zahn-Wellens ha permitido determinar la biodegradabilidad de un producto comercial para el control de derrames de hidrocarburos. El producto comercial OSCK se considera biodegradable, de acuerdo a la remoción de 94,5% DQO obtenida en un tiempo de 28 días. La cinética de biodegradación sigue el comportamiento de una ecuación polinómica de segundo orden. La aplicación combinada de las técnicas instrumentales utilizadas permitió definir que el uso de este producto no va a originar un impacto secundario al ecosistema, lo cual se puede hacer extensivo para otros productos comerciales que se ofertan para enfrentar derrames.

## Referencias bibliográficas

1. EPA 542-F-96-026. "Guía del ciudadano: atenuación natural". Oficina de Innovaciones tecnológicas. 1996. Disponible en: <https://nepis.epa.gov/EPA/html/10002T06>.
2. TORRES RODRÍGUEZ, D. "El papel de los microorganismos en la biodegradación de compuestos tóxicos". *Ecosistemas*, 2003, **2**, 1-5. ISSN: 1132-6344.
3. CHAN QUIJANO, J. G. Evaluación de la degradación de hidrocarburos totales del petróleo por bioestimulación con abonos orgánicos asociados a especies arbóreas. 2015. Tesis presentada para optar al grado de Maestro en Ciencias en Recursos Naturales y Desarrollo Rural. Tabasco, Cuba.
4. BERMÚDEZ ACOSTA, J. Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos a partir del uso de un consorcio bacteriano alóctono en la zona costera de Punta Majagua. Cienfuegos, Cuba. 2012. Tesis presentada para optar por el grado académico de Master en Ciencias Técnicas. Santa Clara, Cuba.
5. WAFO, E. *et al.* "Historical Trends of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in the

Sediments of Toulon Bay (South of France)”. *International Journal of Environmental Monitoring and Analysis* 2017, **5**(6), 150-158. ISSN: 2328-7659.

6. ARBELI, Z. Biodegradation of Persistent Organic Pollutants (POPs): I. The case of Polychlorinated Biphenyls (PCB). *Acta Biológica Colombiana*, 2009, **14** (1), 57 – 88. ISSN: 0120-548X.

7. PŁUCIENNIK-KOROPCZUK, E., MYSZOGRAJ, S. Zahn-Wellens test in industrial wastewater biodegradability assessment. *Civil and Environmental Engineering Reports*, 2018, **28** (1), 077-086, ISSN: 2450-8594.

8. PONCE, S.; GUERRERO V. Propiedades mecánicas de compuestos biodegradables elaborados a base de ácido poliláctico reforzados con fibras de abacá. *Revista EPN*, 2014, **33**(2), 1-11. ISSN: 1390-0129.

9. ISO. ISC Fields 13.060.50 Examination of water for chemical substances. [on line] (consulted 01/04/2019). Disponible en: <http://www.iso.org/>. 2019.

10. ROSABAL, Y. *et al.* Evaluación de la demanda química de oxígeno en aguas de la provincia de Granma, Cuba. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales*, 2012, **8** (1), 15-20. ISSN: 2310-2799

11. BOYD, C. E. *Water Quality. An Introduction*. 2<sup>nd</sup> ed. 357pp. Switzerland. Springer. 2015. ISBN: 978-3-319-17446-4.

12. ISO. Water quality. Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in aqueous medium. Static test (Zahn-Wellens method). ISO 9888:1999 (confirmed 2015).

13. QUÍMICA DE EMULSIFICANTES, S. de R.L. de C.V. Alcoholes grasos etoxilados. 2018. [en línea] (consultado 03/10/2018). Disponible en: <http://www.qdem.com.mx/productos>.

14. UNE. Calidad del agua determinación del índice de hidrocarburos. Parte 2. Método por extracción con disolvente y cromatografía de gases. UNE-EN ISO 9377-2. España. 2001.

15. EPA Method 8270d. *Semi volatile organic compounds by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS)*. 1998, CD-ROM, Revision 4, 61 pp, US EPA, Washington D.C.

16. TRATHNIGG, B. *et al.* Molecular characterization of ethoxylates by complementary chromatographic techniques. *Tenside, Surfactants, Detergents*. 2003, **40** (3), 1-7. ISSN: 0040-3490.

17. MARQUEZ, R., FORGIARINI, A. M., LANGEVIN, D., SALAGER, J. L. Instability of Emulsions Made with Surfactant–Oil–Water Systems at Optimum Formulation with Ultralow Interfacial Tension. *Langmuir*. 2018, **34**, 31, 9252–9263. ISSN: 1520-5827.

18. MAGNUS, B. O.; ANDERSSON, J. W. AND L. G. BLOMBERG. Synthesis of fatty alcohol mixtures from oleo chemicals in supercritical fluids. 2000, *Green Chemistry*, **2**, 230–234. ISSN: 1463-9270.

19. EURACHEM/CITAC guide. Quantifying uncertainty in Analytical Measurement, 2012. 3<sup>rd</sup> Edition. 141pp. S. L. R. Ellison and A. Williams (Eds). ISBN: 978-0-948926-30-3.

20. VICENTE, R. Evolución de la toxicidad y biodegradabilidad de contaminantes persistentes en medios acuosos durante un proceso de fotocátalisis solar empleando diferentes técnicas analíticas. 2007. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia, España.

## **Conflicto de interés**

Los autores expresan que no hay conflictos de intereses en el manuscrito presentado.

## **Contribución de los autores**

Miguel Angel Díaz Díaz: 40 % Elaboración, ejecución y dirección de las pruebas de laboratorio, recopilación y obtención de datos primarios, procesamiento de resultados, participó activamente en la discusión de los resultados, elaboración de artículo, revisión y aprobación de la versión final.

Lester Rivas Trasancos: 30 % Participó en la elaboración, ejecución y dirección de las pruebas de laboratorio, recopilación, obtención de datos primarios, procesamiento de resultados y contribuyó en la elaboración de artículo.

Jeniffer de la C. Martínez Gonzáles: 20 % Participó en la ejecución e interpretación de resultados de los análisis por CG-EM.

Raisa Teuteló Núñez: 10 % Participó en la ejecución de los ensayos de las pruebas de laboratorio, recopilación y obtención de datos primarios.

Daylén Salazar Alemán: 10 % Participó en la ejecución de los ensayos de las pruebas de laboratorio, recopilación y obtención de datos primarios.