

DETERMINACIONES CINÉTICAS EN PELÍCULAS BIOLÓGICAS

SIMÓN GONZÁLEZ MARTÍNEZ *
CLAUDIA NAVA RAMÍREZ **

*** Investigador, Instituto de Ingeniería, UNAM**

**** Becaria, Instituto de Ingeniería, UNAM**

RESUMEN

1. INTRODUCCIÓN	1
2. TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES	5
2.1 <i>Procesos biológicos</i>	6
3. BIODISCOS	7
3.1 <i>Descripción del sistema</i>	7
3.2 <i>Operación del proceso</i>	9
4. BIOQUÍMICA Y ECOLOGÍA DE SISTEMAS MICROBIANOS EN PELÍCULAS BIOLÓGICAS	11
4.1 <i>Alimentación y metabolismo</i>	12
4.2 <i>Ecología microbiana</i>	16
5. RESPIROMETRÍA	23
5.1 <i>Respiración</i>	23
5.2 <i>Relación entre el consumo de sustrato y de oxígeno</i>	24
5.3 <i>Respirómetro Walburg</i>	25
6. CINÉTICA ENZIMÁTICA	31
6.1 <i>Ecuación de Michaelis y Menten</i>	32
6.2 <i>Ecuación de Lineweaver y Burk</i>	35
7. MATERIAL Y MÉTODO	37
7.1 <i>Descripción y funcionamiento del respirómetro</i>	37
7.2 <i>Condiciones de operación del sistema</i>	41
7.3 <i>Generación y caracterización de las películas biológicas</i>	42
7.4 <i>Obtención del volumen de los frascos de reacción y de las constantes de los frascos</i>	43
7.5 <i>Verificación del sistema</i>	44
7.6 <i>Sustratos utilizados</i>	44
7.7 <i>Determinaciones de la cinética de consumo de sustratos</i>	45
8. RESULTADOS	47
8.1 <i>Verificación de la operación del sistema</i>	47
8.2 <i>Cinética de consumo de sustratos orgánicos</i>	49
8.3 <i>Cinética de eliminación de material nitrogenado</i>	62
9. CONCLUSIONES	71
BIBLIOGRAFÍA	73

ABSTRACT

This work proposes an experimental method for the determination of the substrate removal kinetics in biofilms of ammonia and organic pollutants in wastewater. A modified *Warburg* respirometer allows the measurement of respiration curves of a biofilm when consuming different substrates. For the experiments, biological films were generated by placing glass disks with a rough surface on the plastic material of the first and third stages of an RBC treating wastewater from the main campus of the National University of Mexico. The tested substrates were sodium acetate, glucose, and municipal wastewater for a biofilm removing organic material, and ammonium chloride for a biofilm with nitrification activity. The kinetic model used is the classic *Michaelis-Menten* model and the determined kinetic parameters were $V_{\text{máx}}$ and k_s . It is concluded that: 1) the proposed modified respirometer allows the kinetic determination of the *Michaelis-Menten* constants; 2) the *Michaelis-Menten* constants are affected by ecological, physiological and biochemical processes in the biofilm.

RESUMEN

Este trabajo propone un método experimental para la determinación de la cinética de eliminación de sustratos (contaminantes en aguas residuales) orgánicos y nitrogenados al ser consumidos por películas biológicas. Se basa en la utilización de un respirómetro *Warburg* modificado el cual permite determinar las curvas de consumo de oxígeno, y en consecuencia, las de consumo de sustrato, así como de respiración endógena. Para los experimentos se utilizaron películas biológicas generadas en la primera y tercera etapas del biodisco que se encuentra en la planta para tratamiento de aguas residuales de Ciudad Universitaria, DF. Los sustratos utilizados fueron acetato de sodio, glucosa y aguas residuales para películas que eliminan material carbonoso, mientras que, para películas nitrificantes, cloruro de amonio y agua de la tercera etapa del sistema. El modelo que se empleó para la determinación de los parámetros cinéticos $V_{m\acute{a}x}$ y k_s , es el propuesto por *Michaelis y Menten*. Con lo cual se concluye que: 1) El respirómetro construido para realizar este trabajo es una herramienta eficiente para la determinación de la cinética de eliminación de sustratos con películas biológicas; 2) Los valores para las constantes de *Michaelis y Menten* son afectados por gran número de procesos bioquímicos, fisiológicos y ecológicos. El conocimiento de la cinética de degradación de contaminantes por biopelículas es importante para un mejor entendimiento de los procesos biológicos involucrados en el tratamiento de aguas residuales.

1. INTRODUCCIÓN

En México, como en muchos países, el suministro de agua es uno de los principales problemas debidos al incremento en la demanda de este recurso en los sectores agrícola, poblacional e industrial. Esto ha traído como consecuencia una sobreexplotación de los mantos freáticos con la consiguiente desaparición de gran parte del sistema lacustre que existía en la época prehispánica.

El agotamiento de las fuentes de suministro y la posible degradación de la calidad del agua, como resultado de la explotación de los mantos acuíferos, han complicado el abastecimiento a la ciudad y obligado a utilizar fuentes cada vez más alejadas para contribuir a satisfacer los requerimientos de la población. La necesidad de agua ha precisado transportarla de cuencas vecinas, primero del Lerma y recientemente del Cutzamala, construyéndose infraestructura muy costosa para su captación y conducción (*Departamento del Distrito Federal*, 1991).

El problema se agudiza aún más por el uso irreflexivo del servicio; en este caso, es indispensable establecer una nueva actitud basada en la convicción de que es posible alcanzar los mismos niveles de bienestar evitando el desperdicio y utilizando menores cantidades de agua. Asimismo, las actividades domésticas e industriales producen elevados volúmenes de agua contaminada, la cual, en la mayoría de los casos, es vertida en cuerpos de agua, desperdiciándose su potencial y constituyendo una fuente de contaminación (ibídem).

A pesar de lo anterior, suministrar este recurso con la calidad que la población requiere, es una meta factible de lograr si se cuenta con la cooperación responsable por parte del usuario y el apoyo de las autoridades para el diseño e implantación de acciones orientadas al mejor aprovechamiento de dicho recurso.

Las opciones para el suministro de agua son cada vez más importantes y particularmente, el tratamiento biológico de aguas residuales y el reúso de agua tratada, ofrecen amplias posibilidades para la recuperación de este recurso (*Comisión del Plan Nacional Hidráulico*, 1981).

Los tratamientos biológicos son, hasta la fecha, los procesos más utilizados a nivel mundial para el tratamiento de aguas residuales. Por medio de estos y de una posterior desinfección de las aguas tratadas es posible utilizarlas para procesos industriales o riego de áreas verdes.

El objetivo principal del tratamiento biológico de aguas residuales es la eliminación de materia orgánica contaminante utilizando microorganismos. Otra posibilidad de los procesos biológicos, principalmente para el tratamiento de aguas residuales domésticas y municipales, es la eliminación de compuestos nitrogenados y de fósforo. En este proceso, se involucran necesariamente muchos aspectos entre los cuales la cinética enzimática, es decir el estudio de las reacciones bioquímicas, tiene esencial importancia para:

- Saber que tipo de reacción enzimática se está llevando a cabo y conocer la rapidez con la cual se degradan los contaminantes.
- Conocer el potencial máximo de eliminación de materia contaminante en un sistema específico.
- El conocimiento de la cinética en películas biológicas y de la hidrodinámica del sistema permite llegar a diseños óptimos de sistemas para tratamiento de aguas residuales (*Segel*, 1975).

Las formulaciones cinéticas y los modelos pueden llegar a ser ecuaciones predictivas y son útiles, como ya se mencionó, para el diseño y operación de los sistemas para tratamiento de aguas residuales.

Existe gran variedad de métodos físicos y químicos, para cuantificar cinética enzimática; sin embargo, muchos de ellos no dan resultados reproducibles. La experiencia práctica puede guiar a diseños adecuados y generalmente basados en consideraciones de tipo conservador, pero esto dificulta la optimización del diseño.

Las primeras determinaciones cinéticas en microorganismos vivos fueron hechas por *Warburg* en los años veinte. Estas se realizaron midiendo la absorción de oxígeno en glóbulos rojos con un respirómetro, el cual posteriormente llevó su nombre. Este aparato ha sido ampliamente utilizado en estudios de cinética enzimática en aguas de desecho, determinando la cinética de consumo de oxígeno y consecuentemente, la cinética de consumo de sustratos por organismos aerobios (*Gaudy y Gaudy*, 1981).

Los filtros rociadores y biodisco son sistemas para tratamiento de aguas residuales cuyo diseño original y operación han sido tradicionalmente aerobios. Desarrollos recientes de sistemas para tratamiento de aguas residuales utilizan también biopelículas sumergidas aerobias. González y Duque (1991) y González y Elías (1989) señalan que algunos autores (*Kornegay y Andrews*, 1968, *Hartmann*, 1960, *Opatken*, 1982, *Stover y Kincannon*, 1982) obtienen los parámetros cinéticos considerando estos sistemas como caja negra lo cual es cuestionable, ya que los sistemas anteriormente mencionados consisten de varias etapas degradativas (degradación secuencial) que difieren entre sí en población microbiana, especializándose cada una de estas en degradar un sustrato específico.

Objetivos y alcances

Los objetivos de este trabajo son:

- La implantación del método de respirometría desarrollado por *Warburg* para realizar estudios de cinética enzimática en películas biológicas.
- Determinar la cinética de eliminación de material carbonoso y compuestos nitrogenados en películas biológicas.

Dentro de los alcances de la investigación se considera la utilización de un respirómetro *Warburg* modificado para la medición de la cinética de eliminación de sustratos a través de medir el consumo de oxígeno. Las evaluaciones cinéticas se realizarán tomando como base el modelo cinético propuesto por *Michaelis y Menten* (*Segel*, 1975).

Como material para el estudio se utilizará la biopelícula generada en el biodisco de la planta para tratamiento de aguas residuales de Ciudad Universitaria.

2. TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES

El tratamiento de aguas residuales puede ser una combinación de procesos físicos químicos y biológicos que pueden ser utilizados como tratamientos primarios, secundarios y terciarios. Generalmente, se emplean combinaciones de algunos de ellos en forma secuencial, lo cual dependerá del tipo de agua residual y de la finalidad que se persiga.

El objetivo de los procesos primarios es eliminar los sólidos de mayor tamaño, así como los más fácilmente sedimentables; para lograrlo, se usan métodos como cribado, sedimentación, flotación, filtración, etc.

En los procesos secundarios o biológicos se utilizan microorganismos para eliminar el material orgánico disuelto. Estos procesos involucran la intervención de organismos de tipo procarionte como bacterias y algas verde-azules y de tipo eucarionte como algas, hongos, protozoarios y metazoarios. Dentro de estos procesos se encuentran: reactores anaerobios de lecho empacado, lagunas facultativas, lodos activados, biodiscos, filtros percoladores, etc.

Los procesos terciarios se basan en sistemas físicos, químicos y biológicos y se aplican cuando se desea obtener agua de mejor calidad que la lograda en los tratamientos previos. A partir de estos procesos es posible eliminar material orgánico no biodegradable o de difícil biodegradación, iones y coloración del agua (*Luna et al, 1990*).

2.1 *Procesos biológicos*

Los procesos biológicos pueden dividirse en función del tipo de metabolismo empleado por los microorganismos que intervienen en él. De acuerdo con este concepto existen tres tipos de procesos: anaerobios, aerobios y mixtos.

2.1.1 Procesos biológicos anaerobios

En estos procesos la remoción de materia orgánica se hace por medio de microorganismos que no requieren oxígeno molecular libre en solución. Los reactores anaerobios de lecho empacado y los de lecho granular son ejemplos de este tipo de proceso.

2.1.2 Procesos biológicos aerobios

En esta clase de procesos la remoción de material orgánico soluble se hace por medio de microorganismos que requieren para su desarrollo de suficiente oxígeno molecular libre en solución. Procesos biológicos de estas características son lodos activados, biodiscos, filtros rociadores, etc.

2.1.3 Procesos biológicos mixtos o facultativos

Consisten en una combinación de los procesos anteriores; por tanto, intervienen microorganismos aerobios, microaerofílicos, anaerobios y facultativos. Ejemplo de estos procesos son las lagunas facultativas y modificaciones del sistema de lodos activados para eliminación de nitrógeno y fósforo.

3. BIODISCOS

El desarrollo moderno de los biodiscos se inició en Alemania en los años cincuenta y su comercialización masiva comenzó hasta principios de los setenta en Estados Unidos. Actualmente, los biodiscos son sistemas ampliamente utilizados y son considerados como uno más de los sistemas convencionales para tratamiento de aguas residuales.

Algunas de las ventajas de este sistema son: bajos requerimientos de energía, tiempos de retención hidráulica cortos, capacidad de soportar cargas orgánicas variables, baja producción de lodos, mantenimiento mínimo y no se requiere de personal técnico especializado para su operación, ni supervisión frecuente. Sin embargo, la inversión inicial de capital asociada a su construcción y arranque es alta (*Antonie, 1975*).

3.1 Descripción del sistema

Dependiendo del fabricante y del tamaño de la planta de aguas residuales, los discos pueden medir desde 0.5 hasta 5.0 m de diámetro. Los materiales más comunes para la fabricación del material de soporte de la biopelícula son poliestireno, polietileno, poliuretano y fibra de vidrio. Se encuentran montados sobre un eje horizontal y están ubicados sobre un tanque de concreto a través del cual fluyen las aguas residuales. El tanque se encuentra dividido en 3 ó 4 secciones o etapas, cada una especializada en degradar un sustrato diferente (*Winkler, 1986*).

El reactor gira lentamente en el tanque, usando sistemas de impulsión mecánicos o inducidos por aire. Comúnmente, la porción sumergida de los discos es de aproximadamente 40 por ciento de la superficie total.

Una vez que el sistema comienza a funcionar, los microorganismos presentes en el agua de desecho se adhieren al medio de soporte y empiezan a multiplicarse. Gradualmente, la superficie se va cubriendo de una película biológica, la cual puede medir de 0.1 a 0.4 mm. El desarrollo de la biopelícula inicia con el primer contacto del material plástico con el agua residual; su actividad degradadora de material orgánico requiere aproximadamente de una semana (*Antonie, 1975*), aunque puede tardar meses hasta alcanzar el equilibrio de las comunidades microbianas.

3.1.1 Formación de la película biológica

El proceso de formación de la película biológica sobre la superficie de los biodiscos se divide en tres fases: inducción, acumulación y estabilización (*Luna et al, 1990*).

Fase de inducción. Comprende la adsorción de los compuestos orgánicos sobre la superficie húmeda de los discos, la cual se lleva a cabo durante las inmersiones del medio de soporte en el agua de desecho por tratar. Se considera que la adsorción o adhesión de los compuestos orgánicos en la superficie húmeda del soporte es un requisito previo para el desarrollo de la película biológica y la consecuente fijación de la biomasa (*Norouzzian y Deloya, 1984*).

Cuando las cantidades adecuadas de nutrientes orgánicos, sales minerales y oxígeno están disponibles sobre dichas superficies, los microorganismos colonizan las superficies húmedas sólidas formando una matriz gelatinosa.

Fase de acumulación. En esta fase hay un crecimiento logarítmico de los microorganismos continuando así hasta que el medio de soporte está completamente cubierto. Se observa un periodo de acumulación constante, el cual termina por efecto del esfuerzo

cortante entre la biopelícula y la superficie del líquido. Este proceso previene la acumulación de mayor cantidad de microorganismos. Los nutrientes y el oxígeno se suministran a través de la película biológica por difusión. A medida que el espesor de la película aumenta, se hace más factible la generación en los estratos más profundos de zonas con procesos anaerobios.

Fase de estabilización o *plateau* (meseta). En esta fase la película biológica desprendida y la producida se encuentran en equilibrio dinámico, manteniéndose un espesor constante. El mantenimiento de la estructura de la biopelícula es el efecto combinado de la reproducción celular y el desprendimiento lento de la biopelícula. La condición de aumento del espesor por crecimiento persiste hasta que los nutrientes y el oxígeno no alcanzan a difundirse hasta las capas más profundas de la biopelícula. Los organismos de estas capas modifican sus sistemas enzimáticos para continuar sus funciones bajo condiciones anaerobias (fermentación); su fuente de alimento es, entonces, el polímero que permite la adhesión entre las bacterias. La adhesión entre las bacterias se debilita, permitiendo que, con la acción de las fuerzas mecánicas entre la biopelícula y el agua, fracciones pequeñas de la biopelícula se desprendan, dejando al descubierto las capas más profundas de microorganismos y permitiendo que el proceso de crecimiento se repita.

3.2 Operación del proceso

El proceso general consta de tres partes principales: sedimentación primaria para separar los sólidos en suspensión que entran con el agua residual cruda; tren de biodiscos para transformación del material orgánico contaminante en sustancias inorgánicas y microorganismos y, por último, sedimentación secundaria para separar los microorganismos formados durante las transformaciones bioquímicas en la biopelícula de los biodiscos (fig 3.1).

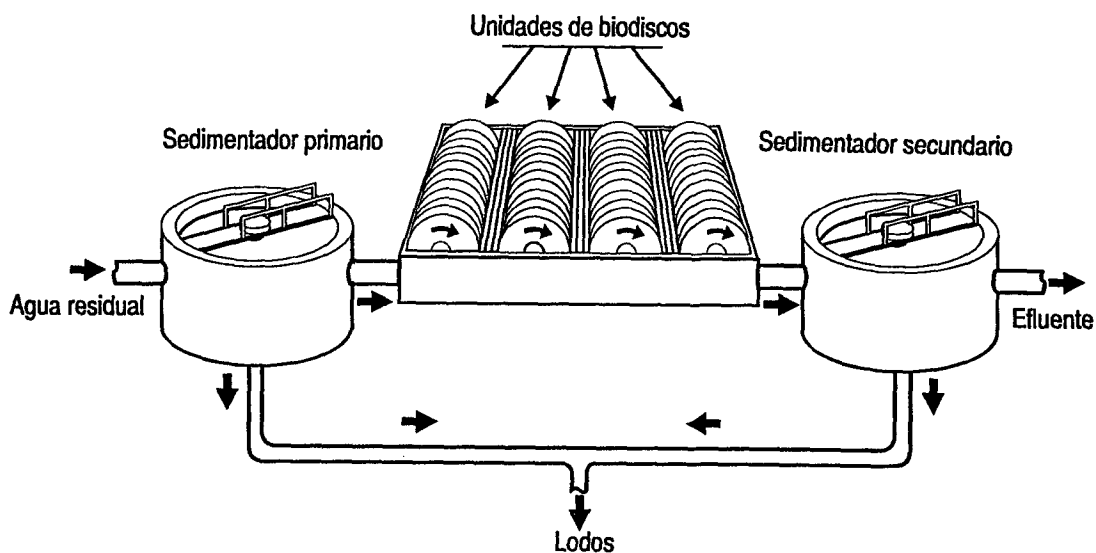


Fig 3.1 Planta para tratamiento de aguas residuales con biodiscos (Autotrol, 1978)

La rotación del biodisco permite, además del mezclado del agua en el tanque, la adherencia de una película de agua sobre la biopelícula. Esta *película líquida* tiene dos funciones: sirve como paso intermedio para la difusión del oxígeno atmosférico hasta la capa de microorganismos y suministra los nutrientes (material orgánico) a los mismos. El proceso de rotación es continuo, por tanto, la película líquida se renueva constantemente. El contacto de la biopelícula con el oxígeno del aire y con los nutrientes del agua residual se alterna al girar continuamente (Antonie, 1975).

El agua residual tratada y la biomasa que se desprende de la biopelícula pasan a través de cada una de las etapas del sistema, incrementándose el grado de purificación del agua en cada una de estas. La configuración por etapas garantiza la remoción secuencial de sustratos y conduce al desarrollo de diferentes poblaciones en cada una de ellas, cada una especializada en la degradación de las sustancias que no fueron degradadas en las etapas previas.

La biomasa desprendida y suspendida en el agua sale de la última etapa del sistema y pasa a un sedimentador secundario, donde se separan los sólidos.

4. BIOQUÍMICA Y ECOLOGÍA DE SISTEMAS MICROBIANOS EN PELÍCULAS BIOLÓGICAS

Los procesos biológicos involucrados en la degradación de la materia orgánica en sistemas para tratamiento de aguas residuales están determinados principalmente por mecanismos bioquímicos y ecológicos, por lo que es necesario el conocimiento de estos para lograr una mejora en la eficiencia del proceso de depuración.

Las aguas residuales domésticas contienen principalmente residuos del metabolismo humano y desechos resultantes de otras actividades. La mayor parte del contenido de estos desechos son carbohidratos tales como glucosa, lactosa, galactosa, etc (*Painter*, 1983). Estos compuestos, junto con otros compuestos solubles como ácidos orgánicos y aminoácidos, se asimilan más fácilmente por una gran variedad de microorganismos, a diferencia de otros insolubles, como la celulosa, algunos polipéptidos y grasas, los cuales son más difíciles de degradar.

Algunos investigadores sugieren que todos los compuestos orgánicos contenidos en aguas de desechos municipales pueden ser metabolizados por microorganismos, a excepción de algunas sustancias recalcitrantes, las cuales no son susceptibles de un ataque enzimático en corto plazo (*González y Díaz*, 1987).

4.1 Alimentación y metabolismo

La nutrición y respiración microbianas se llevan a cabo por medio de procesos de difusión los cuales se muestran en la fig 4.1. Los nutrientes (contaminantes orgánicos) y el oxígeno se difunden a través de la interfase entre la biopelícula y la película líquida que se forma sobre la película biológica (*Harremões, 1978*).

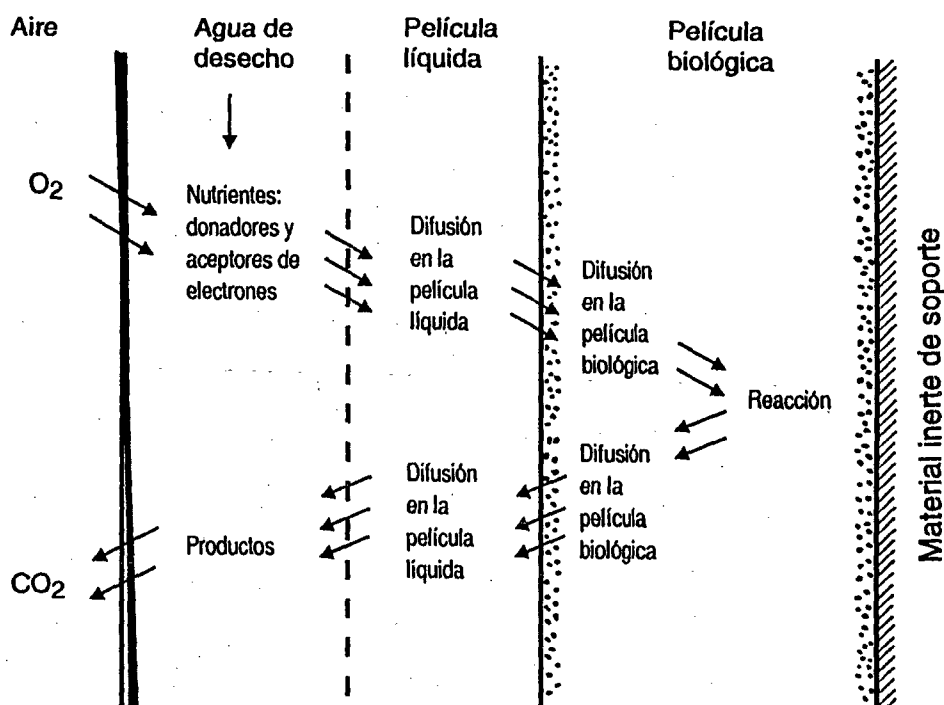


Fig 4.1 *Procesos involucrados en el transporte de nutrientes y productos en la película biológica* (*Harremões, 1978*)

Los compuestos coloidales insolubles y las grandes moléculas orgánicas que por su tamaño no pueden atravesar la pared celular, son hidrolizadas por enzimas extracelulares o enzimas ligadas a la superficie celular. Las pequeñas moléculas resultantes de la hidrólisis son entonces introducidas a la célula por diferentes mecanismos que van desde la difusión hasta el transporte activo por permeasas y transportasas. Una vez en la célula, el sustrato se transforma y metaboliza por una serie de sistemas multienzimáticos, hidrolíticos, oxidativos y de síntesis.

4.1.1 Degradación de material carbonoso

La degradación de materia orgánica se lleva a cabo durante el metabolismo celular. Metabolismo es un término que involucra a todas las reacciones por medio de las cuales la célula procesa su alimento para obtener energía y obtiene los compuestos necesarios para formar nuevos componentes celulares. Este proceso tiene lugar a través de secuencias de reacciones consecutivas catalizadas enzimáticamente, en las cuales participan muchos compuestos intermediarios (*Gaudy y Gaudy, 1981*).

El metabolismo se divide en catabolismo y anabolismo. El catabolismo se refiere a la fase degradativa del metabolismo. Las moléculas orgánicas como carbohidratos, lípidos y proteínas son degradadas a productos más pequeños y sencillos, por ejemplo, ácido láctico, ácido acético o bióxido de carbono. El catabolismo va acompañado de liberación de la energía inherente a la estructura de las moléculas degradadas; esta energía se conserva en forma de trifosfato de adenosina (ATP) (*Lehninger, 1976*).

El anabolismo es la fase de construcción o fase de síntesis del metabolismo; también se llama de biosíntesis. En el anabolismo las moléculas pequeñas o precursoras se ordenan para llegar a formar los componentes moleculares relativamente grandes de las células, tales como polisacáridos, ácidos nucleicos, proteínas y lípidos. La biosíntesis ocasiona un incremento en el tamaño y complejidad de la estructura, por tanto, precisa de energía libre, la cual es aportada por la escisión de ATP. El catabolismo y el anabolismo pueden llevarse a cabo de forma simultánea en las células (*ibídem*).

La degradación enzimática de los nutrientes (catabolismo), ya sean polisacáridos, lípidos o proteínas se lleva a cabo a través de reacciones enzimáticas consecutivas, organizadas en tres etapas (*Lehninger, 1976*), las cuales se muestran en la fig 4.2.

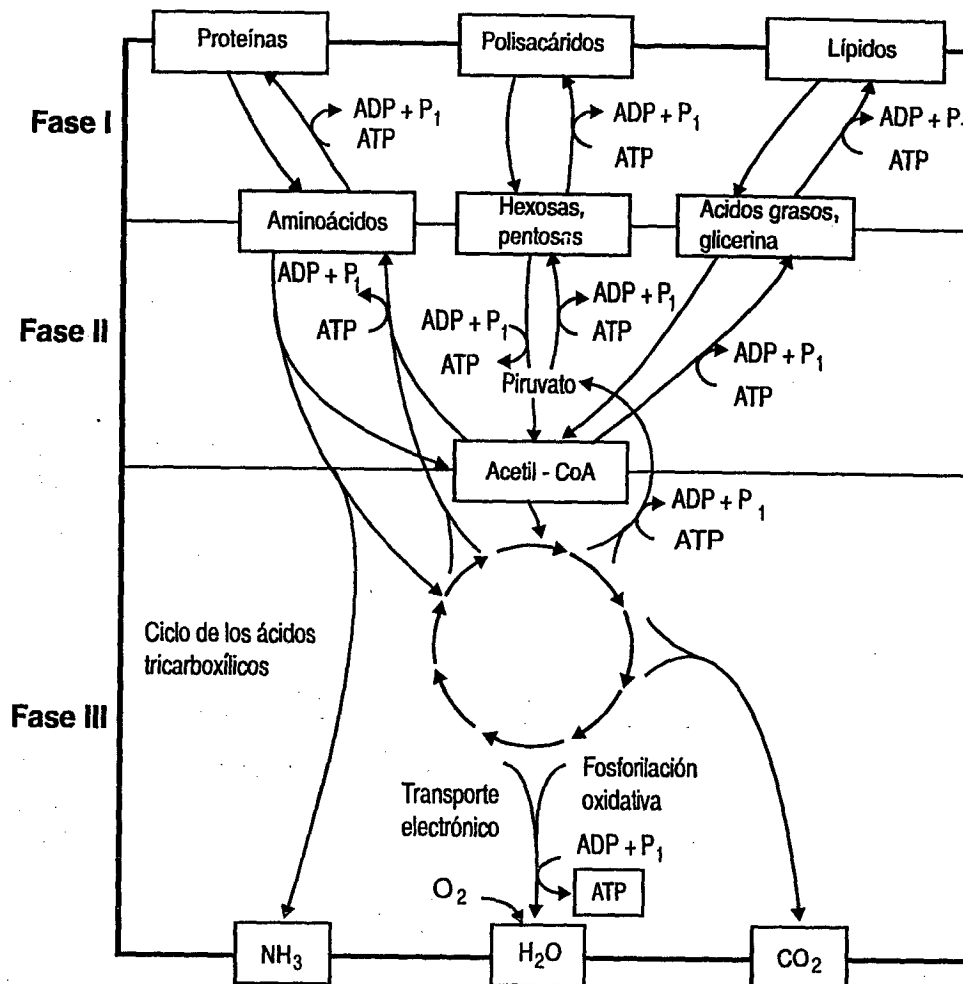


Fig 4.2 Fases del metabolismo aerobio (Lehninger, 1976)

En la fig 4.2 las flechas descendentes muestran las principales vías catabólicas o de degradación. En la primera fase, las macromoléculas se degradan a moléculas más pequeñas; en la segunda, los productos derivados del paso anterior son convertidos en compuestos intermediarios que entran a vías centrales catabólicas o de degradación. En la última fase o vía catabólica común, los compuestos intermediarios se oxidan a anhídrido carbónico y agua. Durante esta última etapa se libera gran cantidad de energía que se conserva en forma de enlace fosfato del adenosín trifosfato. La energía producida se usa para síntesis de nuevo material celular y para propósito de mantenimiento, como locomoción, calentamiento, etc.

La síntesis celular ocurre durante las tres fases. En la misma fig 4.2 las flechas ascendentes señalan las vías de síntesis o anabólicas. La síntesis se inicia en la tercera fase del metabolismo; en dicha fase se generan moléculas precursoras. En la segunda estas moléculas se convierten en moléculas que sirven como base para formar macromoléculas en la primera fase.

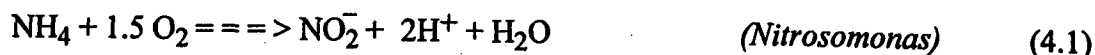
4.1.2 Degradación de material nitrogenado

Entre los principales contaminantes de las aguas residuales se encuentran los compuestos nitrogenados. Estos se presentan en las aguas de desechos en forma de amoníaco, nitritos, nitratos, compuestos orgánicos solubles y materia orgánica en suspensión o en forma de partículas (aminoácidos y proteínas).

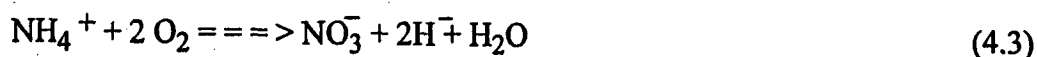
Durante los procesos catabólicos, la mayor parte de estos compuestos se degradan y desaminan para producir anhídrido carbónico y amoníaco (fig 4.2). Parte del amoníaco se asimila a la biomasa por medio de procesos anabólicos. Sin embargo, el proceso biológico natural más importante para la eliminación de amoníaco es la oxidación bacteriana del amoníaco a nitritos y nitratos, denominándose a este proceso *nitrificación*. Si bien la nitrificación transforma al amoníaco, no elimina al nitrógeno, sino que lo convierte en una forma diferente.

Los nitratos y nitritos pueden ser transformados mediante acción bioquímica a nitrógeno molecular gaseoso. Este proceso se conoce como desnitrificación y se lleva a cabo solamente en ausencia de oxígeno molecular o cuando su concentración es muy baja. En estos casos, una gran cantidad de bacterias pueden romper la unión química entre nitrógeno y oxígeno para utilizar el oxígeno como receptor de protones. Se habla entonces de un proceso de respiración en el cual el receptor de protones es el oxígeno de uniones nitrogenadas o sulfatadas y no el oxígeno molecular disuelto.

La nitrificación se realiza en dos pasos por dos especies de bacterias nitrificantes autótrofas:



La reacción global es entonces



En la ec 4.1. se observa que durante la primera etapa se producen protones que acidifican el medio, de manera que el pH tenderá a bajar durante la nitrificación. Cuando la alcalinidad en el medio no logre amortiguar los cambios de pH, esto puede traer como consecuencia una reducción en la eficiencia de nitrificación. Asumiendo que el pH es menor que 8.5, la reacción que se lleva a cabo con los protones liberados, es



De esta forma, el anhídrido carbónico producido durante la neutralización se desprende del medio líquido en forma de burbujas, manteniendo el pH en valores de neutralidad.

4.2 Ecología microbiana

Los sistemas microbianos que se encuentran en forma natural en cuerpos de agua y plantas para tratamiento de aguas residuales son producto de complicadas combinaciones de factores internos y externos, bióticos y abióticos. La composición de organismos es producto principalmente del alimento disponible y tiene un equilibrio que sufre cambios dependiendo de los factores que lo afectan.

4.2.1 Factores que determinan la diversidad y abundancia de especies

Los principales factores que afectan la diversidad y abundancia de los organismos en los sistemas acuáticos naturales y los sistemas para tratamiento de aguas residuales son físicos, químicos y biológicos (*Hawkes, 1983*).

La composición química del agua residual es determinante para la existencia de los organismos. Sin embargo, en algunos casos algunos organismos que originalmente no están presentes en las aguas de desecho se desarrollan a expensas de productos metabólicos de otras especies.

Los sistemas que tratan aguas residuales domésticas tienen usualmente mayor diversidad de organismos que los que tratan aguas con desechos industriales. Esto se debe a que generalmente contienen sustancias tóxicas y/o grandes cantidades de contaminantes que actúan inhibiendo el metabolismo de algunas especies. Al aumentar la concentración de material orgánico se incrementa la abundancia de organismos y se reduce su diversidad y viceversa.

Los factores físicos más importantes que afectan la diversidad y abundancia de especies son las condiciones de operación del sistema para tratamiento de aguas residuales, entre las que se encuentran, temperatura, oxígeno disuelto, luz, naturaleza del medio de soporte y velocidad instantánea del agua dentro del sistema (tiempo de retención hidráulica).

Los principales factores biológicos que afectan los parámetros anteriormente mencionados son las relaciones intraespecíficas e interespecíficas de las especies y, dentro de estas, la competencia y depredación son determinantes en la composición de la biopelícula.

4.2.2 Interacciones poblacionales en biodiscos

Desde el punto de vista de la ecología, los sistemas biológicos para tratamiento de aguas residuales representan ambientes microbiológicos muy complejos. El sistema de biodiscos contiene ecosistemas en los que la pirámide alimenticia está bien definida (ver fig 4.3).

La pirámide indicada en la fig 4.3 representa los diferentes grupos nutricionales en una comunidad; cada sección horizontal se conoce como nivel trófico. Consta de dos partes principales:

- La base constituida principalmente por materia orgánica y sales minerales.
- La pirámide la cual representa los diferentes niveles tróficos presentes en el sistema.

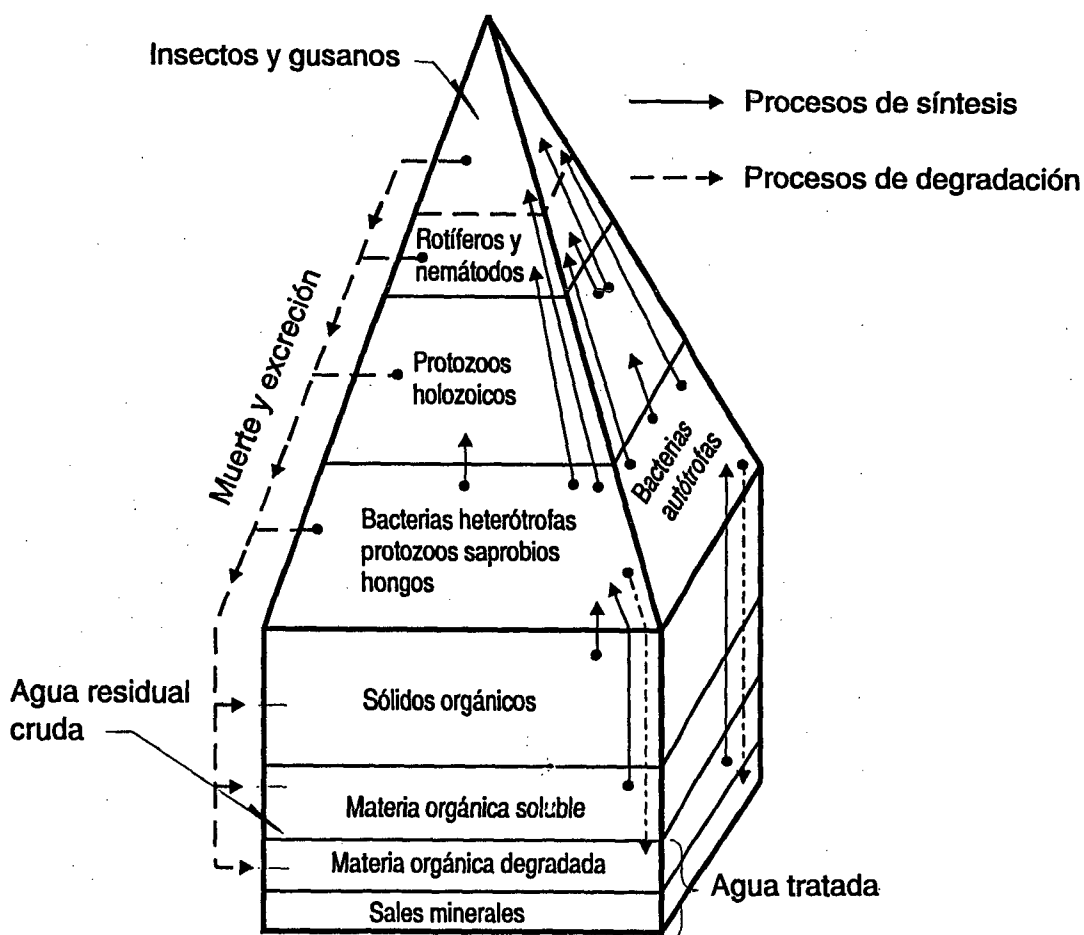


Fig 4.3 Pirámide alimenticia en el biodisco

La base constituye la fuente de alimento de los organismos: sustancias inorgánicas y orgánicas. Dichos compuestos forman parte de la materia contaminante de las aguas de desechos. Ambos tipos de compuestos se utilizan para procesos de síntesis (flechas continuas ascendentes). Asimismo, como resultado de los procesos de degradación (flechas discontinuas descendentes) se produce material orgánico e inorgánico el cual se desecha en el agua.

La pirámide está constituida por cuatro niveles tróficos. Los organismos que ocupan el mismo nivel trófico compiten por la misma fuente alimenticia y el resultado de esta competencia está determinado por los factores físico y químicos anteriormente mencionados. Entre cada nivel trófico se establece una relación presa-depredador y el conjunto de interrelaciones poblacionales resulta en un balance dinámico de las poblaciones.

En el primer nivel trófico de la pirámide están los consumidores primarios: bacterias, protozoos osmotróficos y hongos saprofiticos (*Hawkes*, 1963). Las bacterias, constituyen la mayor parte de la biomasa y el primer paso de la cadena trófica en los sistemas para tratamiento de aguas residuales. Las bacterias predominantes son saprofiticas y son responsables de la degradación y mineralización de compuestos orgánicos en las aguas residuales. También se encuentran bacterias autótrofas quimiosintéticas (quimiolitótrofas) responsables de la oxidación del amoníaco a nitritos y nitratos (*Hawkes*, 1983).

La principal razón del éxito de las bacterias en la degradación de materiales de desecho en comparación con otros protistas está relacionado con su tamaño pequeño y su relativamente grande área superficial expuesta en proporción al volumen que ocupan; esto incrementa su capacidad para intercambio de nutrientes y para la eliminación de catabolitos (compuestos producidos durante el catabolismo celular). Los hongos y los protozoos saprobios se encuentran en el mismo nivel que las bacterias; sin embargo, su crecimiento no es tan rápido (*Hawkes*, 1963).

En el siguiente nivel están los protozoos holozóicos representados principalmente por ciliados. Estos organismos depredan bacterias y otros protozoarios más pequeños lo que en

la práctica ayuda a eliminar a las bacterias que causan turbiedad en el agua (*Hawkes*, 1963).

En la cumbre de la pirámide están los organismos que se dedican principalmente a depredar la película biológica. Están representados por nemátodos, rotíferos, tardígrados y macrofauna que incluye a anélidos. También se pueden encontrar en el biodisco otros depredadores como moluscos e insectos. La presencia de los primeros generalmente se atribuye a bajas concentraciones de material orgánico. En cuanto a insectos, muchos tienen acceso al biodisco pero son pocos los que realmente se establecen en él; por ejemplo, colémbolos y dípteros (*Hawkes*, 1963).

La población depredadora puede funcionar como un medio de control del espesor de la película biológica. *Bal* (1926) y *Meiklejohn* (1932), citados por *Hawkes* (1983), han atribuido a esta actividad la capacidad de incrementar la actividad bacteriana, ya que conservan a las bacterias en la fase de crecimiento logarítmico, manteniéndolas en estado fisiológico joven y, por tanto, en actividad máxima.

No todas las especies de macrofauna son necesariamente consumidoras de la película biológica. Por ejemplo, la larva del díptero *Spaziphora hidromyzina* se alimenta de la materia orgánica que se encuentra en forma de humus (*Hawkes*, 1983). Las algas están restringidas y no son agentes de importancia en la purificación de las aguas. Su presencia se puede observar principalmente en las áreas de la biopelícula expuestas a la luz.

Las relaciones de sinergismo contribuyen también al equilibrio dinámico dentro de las poblaciones del biodisco. Un ejemplo de este tipo de relaciones es descrito por *Jones* y *Carrington* (1972) en *Painter* (1983). Estos autores encontraron que la bacteria *Acinetobacter* no creció en un cultivo con glucosa como única fuente de carbono ya que es incapaz de utilizar este carbohidrato como alimento; sin embargo, al mezclarla con bacterias del género *Aeromonas* en el mismo medio sí hubo crecimiento, esto se debe a que esta última bacteria es productora de acetato el cual es fácilmente asimilado por *Acinetobacter*.

4.2.3 Especies y su distribución en biodiscos

La condición estática de la película biológica y las diferentes características del agua en cada una de las etapas del sistema permiten que existan diferentes poblaciones. En cada etapa se tendrán especies dominantes, lo cual se debe a un proceso de competencia entre ellas y solamente las especies más adaptables a las condiciones particulares podrán dominar.

Una combinación de diferentes especies es más efectiva para eliminar contaminantes que una sola especie aislada. Esto se debe a que una mezcla de organismos es capaz de metabolizar diferentes compuestos y una sola especie degrada solamente algunos compuestos y no metaboliza las sustancias excretadas por ella misma.

En las primeras etapas del sistema predominan bacterias heterótrofas, la mayor parte de estas son *Gram negativas* y tienen una temperatura óptima para su desarrollo de 22 °C. Las principales especies son *Zoogloea ramigera*, *Sphaerotillus natans*, *Beggiatoa sp*, *Achromobacter sp*, *Pseudomonas sp* y *Flavobacterium sp*. Johnson citado por Hawkes (1963), considera que *Zoogloea ramigera* es probablemente el organismo más importante en estas etapas y constituye la base estructural y funcional de la película biológica.

En las etapas finales se tiene una mezcla de organismos heterótrofos y autótrofos, donde las bacterias autótrofas nitrificantes son organismos que se encuentran en gran número si el diseño del sistema así lo requiere. Pueden diseñarse biodiscos de tal forma que la actividad (número) de bacterias autótrofas sea despreciable. Los microorganismos responsables del proceso de nitrificación son las bacterias de los géneros *Nitrosomonas*, *Nitrobacter*, *Nitrosococcus* y *Nitrocystis*; los dos primeros géneros son los que participan más activamente (Ramírez, 1988).

Los hongos, organismos heterótrofos, se encuentran principalmente en las primeras etapas del sistema. Los géneros más comunes son *Fusarium sp*, *Geotrichum sp* y *Sepedonium sp*.

Los protozoos también presentan una sucesión de especies. Los protozoos de los filos *Sarcodina* y *Mastigophora*, los cuales se alimentan de sustancias disueltas, se asocian con aguas de desechos con altas concentraciones de material orgánico, por lo cual se les encuentra en las primeras etapas del biodisco. En las etapas intermedias, debido a sus características de depredación, predominan los organismos del filo *Ciliophora*. Conforme se incrementa la purificación del agua de desecho disminuye la concentración de material orgánico, aumentando el número de ciliados holozóicos y de otros ciliados que depredan a las bacterias de las películas biológicas.

Dentro de la población depredadora, los rotíferos son los organismos más activos, entre los cuales se encuentran de forma más común los géneros *Philodina* y *Rotifer*. Los platelmintos más comunes son turbelarios y céstodos, encontrándose planarias, para el primer caso y huevecillos de *Taenia sp* para el segundo caso (Hawkes, 1963).

En algunos biodiscos los anélidos son abundantes y en otros pueden estar ausentes. Los organismos más usuales son los oligoquetos y los hirudíneos. En los primeros la familia más común es *lumbricidae* con la especie *Lumbricus rubellus*. Entre los hirudíneos se pueden encontrar a las especies *Erpobdella sp* y *Glossiphonia sp* (ibidem).

Las especies de moluscos que se han encontrado en este tipo de sistema pertenecen a los géneros *Lymnaea* y *Physa*. Generalmente en los biodiscos no existen insectos voladores; sin embargo, pueden llegar a encontrarse dípteros de la especie *Psychoda alternata* y colémbolos de los géneros *Achorutes*, *Tomocerus*, *Folsomia* (ibidem).

El que una especie sea dominante en una etapa del sistema no significa que este organismo no se encuentre en otras etapas; su abundancia decrece en las zonas donde las condiciones no son adecuadas para su desarrollo.

5. RESPIROMETRÍA

La respirometría se basa en la medición del consumo de oxígeno por microorganismos o por enzimas que utilizan el oxígeno atmosférico como último receptor de electrones. Conociendo el consumo de oxígeno con respecto al tiempo es posible determinar la cinética de eliminación de sustratos, ya que el consumo de oxígeno es función directa del consumo de sustratos.

5.1 Respiración

La respiración aerobia se define como la oxidación de materia orgánica por oxígeno molecular (*Lehninger*, 1976). A través de este proceso los microorganismos aerobios en los sistemas para tratamiento de aguas residuales obtienen energía al degradar la materia contaminante.

Cuando el agua de desecho entra en contacto con una población bacteriana predominantemente heterótrofa, el oxígeno molecular disuelto en el agua se utiliza para oxidar la materia orgánica a anhídrido carbónico y agua. La cantidad de oxígeno consumido y la rapidez con la que se consume varía considerablemente con cada especie, con la naturaleza del sustrato y con las condiciones del medio.

5.2 Relación entre el consumo de sustrato y de oxígeno

El consumo total de oxígeno durante la degradación de un sustrato es la suma de la respiración endógena (respiración de la célula en ausencia de sustratos exógenos) y la respiración exógena (respiración para consumir el sustrato). Para cuantificar la respiración de un sustrato es necesario restar el valor de respiración endógena del valor de respiración exógena.

La fig 5.1 muestra la relación entre el consumo de sustrato y el consumo de oxígeno.

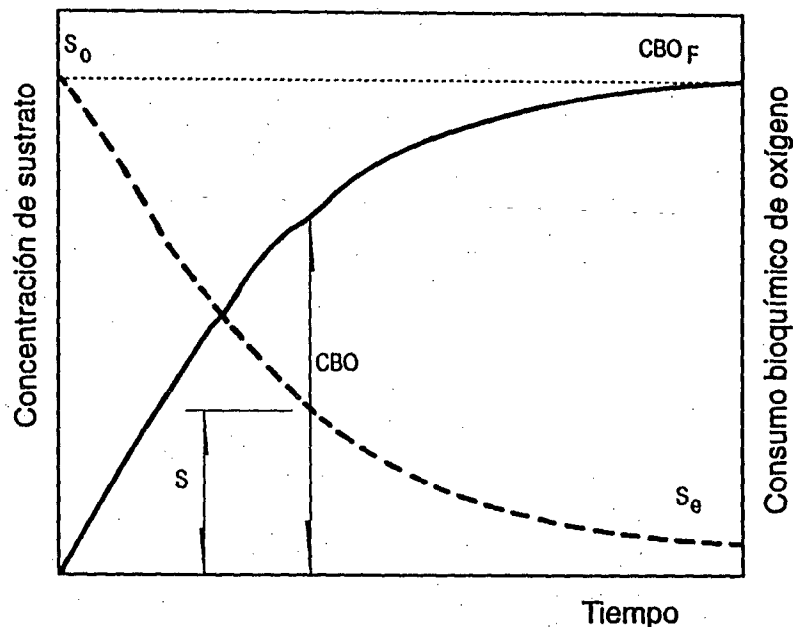


Fig 5.1 Relación entre consumo de sustrato y consumo de oxígeno
(González y Díaz, 1987)

La fig 5.1 muestra cómo un sustrato con una concentración inicial S_0 en un tiempo inicial igual a cero se degrada hasta alcanzar una concentración diferente (S_e) después de un tiempo t . Al mismo tiempo que se consume el sustrato se lleva a cabo el consumo bioquímico de oxígeno (CBO), el cual alcanza un valor máximo (CBO_x) cuando el sustrato ha sido metabolizado completamente. La relación de las cantidades de sustrato y

oxígeno consumidos se mantienen constantes para cualquier tiempo t , lo cual indica que la relación entre el consumo de oxígeno y de sustrato es constante y lineal.

Cuando el sustrato ha sido consumido, las células continúan respirando usando sustancias almacenadas dentro de la célula. Este metabolismo endógeno es el que le permite sobrevivir en condiciones adversas. Los primeros compuestos endógenos o almacenados que se oxidan son el glucógeno y el PHB (polihidroxibutiratos); otros constituyentes celulares (aminoácidos, proteínas y ácidos nucleicos) pueden ser degradados si la célula carece de material de reserva.

5.3 Respirómetro Warburg

El respirómetro *Warburg* es el dispositivo más ampliamente usado para medir el oxígeno consumido por células. El uso del respirómetro *Warburg* tiene como ventajas:

- La posibilidad de efectuar determinaciones de diversas muestras simultáneamente minimizando los errores de muestreo y los ocasionados por el pipeteado de diluciones.
- El valor de consumo de oxígeno se puede calcular sencillamente.

El respirómetro (fig 5.2) consiste en un baño de agua a temperatura constante, un conjunto de matraces especiales equipados con manómetros y un mecanismo agitador (*Gaudy y Gaudy, 1981*).

En este reactor se pueden utilizar varios frascos de reacción al mismo tiempo y su tamaño puede variar entre 15 y 150 ml. En la parte inferior de cada matraz hay un depósito interno central en el que se pone una solución de hidróxido de potasio, la cual sirve para absorber el anhídrido carbónico generado durante la oxidación biológica; la parte externa al depó-

sito sirve para colocar la suspensión de microorganismos o enzimas. En la parte superior lateral hay otro recipiente donde se pone la solución de sustrato.

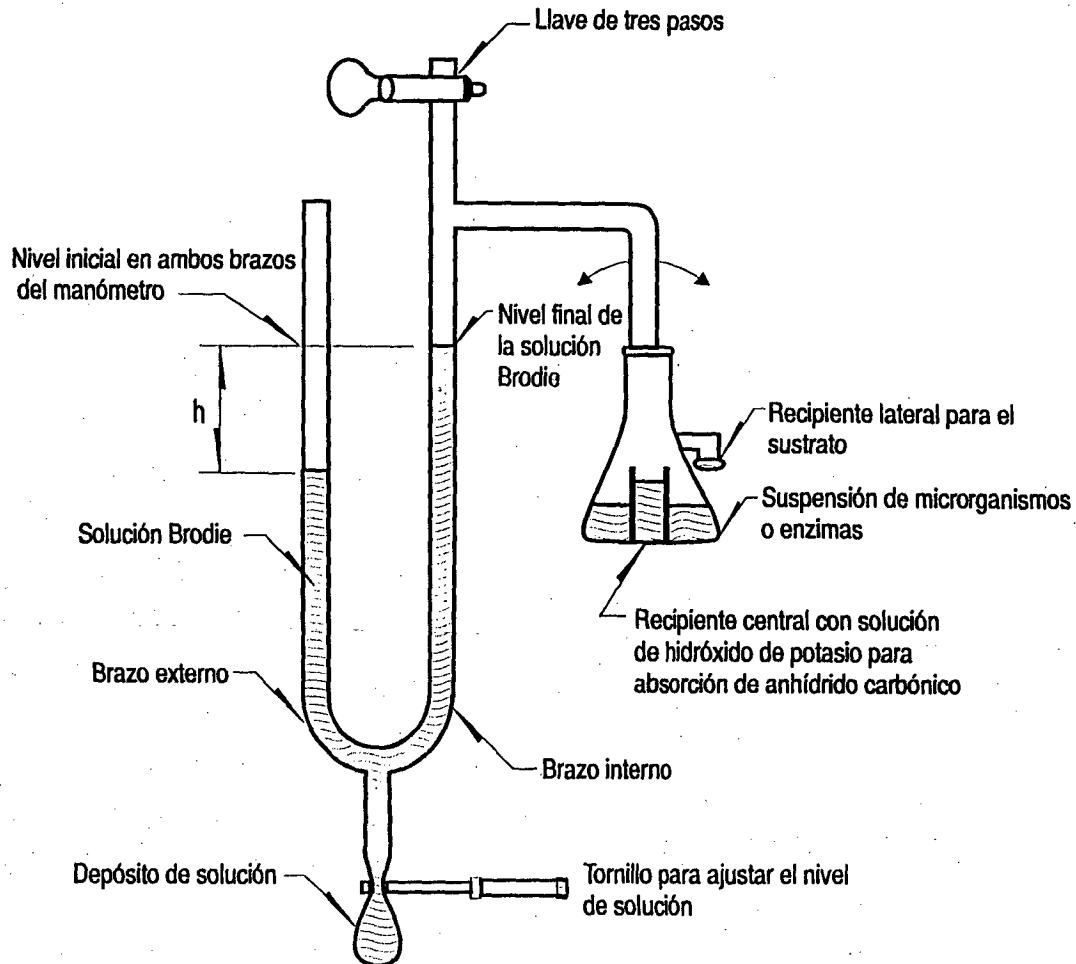


Fig 5.2 Respirómetro Warburg (Gaudy y Gaudy, 1981)

El manómetro tiene una rama abierta y una cerrada que se conecta al matraz; en la parte superior tiene una válvula de tres pasos. Ambas ramas están graduadas en milímetros. En la parte inferior de la unión de las dos ramas del manómetro se encuentra el depósito del fluido manométrico, el cual, presionado por una pinza de tornillo, hace subir o bajar el nivel del fluido.

Los fluidos convencionalmente utilizados en los manómetros son la solución de *Brodie* y la solución de *Kreb*.

El mecanismo agitador realiza movimientos circulares que permiten el mezclado en el interior del recipiente.

5.3.1 Funcionamiento del respirómetro *Warburg*

Inicialmente hay que seleccionar un punto de referencia en el manómetro (generalmente 250 o 150 mm en la rama cerrada), al cual tendrá que ajustarse el nivel del fluido de esta misma rama antes de registrar cualquier cambio de presión.

Para iniciar las determinaciones experimentales es necesario que el contenido del matraz esté mezclado completamente, una vez logrado lo anterior se procede a conectar el manómetro al matraz de reacción.

El recipiente de reacción se sumerge en el agua a temperatura constante. Una vez estabilizada la temperatura, el frasco y el manómetro se inclinan para que el sustrato vierta hacia el compartimiento principal y entre en contacto con la suspensión de microorganismos. Este procedimiento se toma como tiempo de inicio de reacción ($t = 0$).

Los cambios generados por variaciones de temperatura o presión son corregidos por un termobarómetro; este es un matraz que contiene agua destilada. Generalmente, en este matraz se emplea un volumen de agua, igual al que se encuentra en los matraces de reacción. Si el nivel del líquido en la rama abierta del termobarómetro se eleva, hay una disminución en la presión ambiente o un incremento en la temperatura del baño y viceversa.

Para la toma de lecturas, se gira la pinza de tornillo sobre el depósito de fluido manométrico para llevar su nivel al punto de referencia en la rama conectada a la válvula de tres pasos y se mantiene esta a presión atmosférica, se cierra la válvula y se toma la lectura de la rama abierta. Las lecturas se toman generalmente cada 5 minutos, durante este intervalo los microorganismos consumen el oxígeno presente, haciendo que el nivel de fluido suba en la rama cerrada y baje en la rama abierta. Nuevamente, se ajusta el nivel de solución de

la rama cerrada al nivel de referencia, para mantener constante el volumen de gas en la rama del matraz y se toma la lectura de la rama abierta.

Como ya se mencionó, la respiración biológica consume oxígeno y produce anhídrido carbónico. El agotamiento del oxígeno disuelto hace que el oxígeno del aire existente sobre el líquido se disuelva en él disminuyendo la presión en el frasco. La cantidad de oxígeno consumido puede calcularse entonces, por la caída de presión medida por el manómetro.

El valor de consumo de oxígeno se obtiene por medio de la fórmula 5.1

$$\text{Consumo de oxígeno (mg de O}_2\text{/l)} = h (k) \quad (5.1)$$

donde

h diferencia de presión medida en milímetros

k constante del frasco de reacción.

La constante de cada frasco se obtiene a través de la fórmula

$$k = 0.143 [V_g (273/T) + V_f \cdot a \cdot O_2] \cdot (1/V_r) \quad (5.2)$$

donde

V_g volumen del gas dentro del frasco y en el manómetro hasta la marca de referencia (ml)

V_r volumen de la suspensión de microorganismos más el volumen del sustrato (ml)

V_f volumen de la solución de potasio y de sustrato más el volumen de la suspensión de microorganismos (ml)

T temperatura ($^{\circ}$ K)

O_2 coeficiente de difusión de oxígeno en agua a la temperatura de experimentación.

La diferencia entre cada lectura del manómetro representa una cantidad de oxígeno consumido en el periodo estipulado. Las cantidades de oxígeno consumido se van sumando al valor anterior, coincidiendo con el tiempo de las lecturas correspondientes. Debido a que el consumo de oxígeno es directamente proporcional al consumo de sustrato exógeno (ver fig 5.1), el comportamiento de las curvas de oxígeno consumido son un reflejo del comportamiento del consumo de sustrato (fig 5.3).

El manejo matemático y la interpretación de los resultados que se les da a las curvas obtenidas de esta manera se indica en el cap 6.

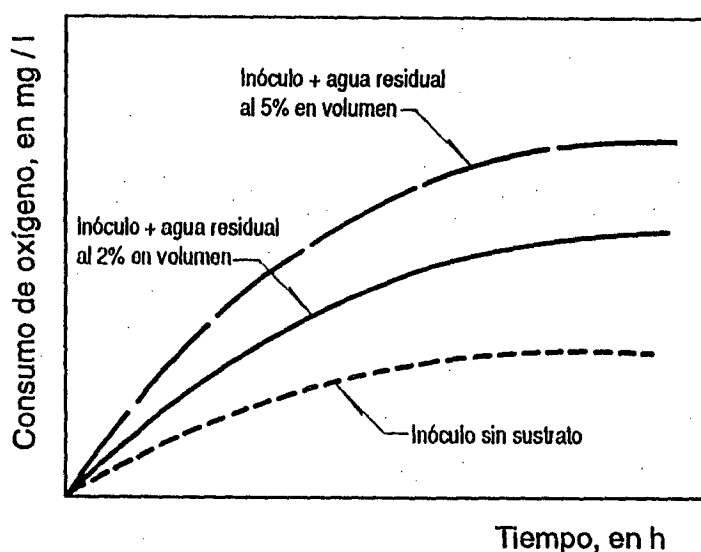


Fig 5.3 Consumo de oxígeno con diferentes concentraciones de aguas residuales

Como se observa en la fig 5.3, el comportamiento seguido al inicio de la degradación de un sustrato es lineal, hasta que se alcanza una estabilización en el consumo de oxígeno, en este punto no hay consumo de oxígeno, por tanto, el sustrato ha sido degradado. Se puede observar también que a mayor cantidad de alimento (sustrato), las curvas alcanzan un valor final mayor.

6. CINÉTICA ENZIMÁTICA

La rapidez de las reacciones que se realizan en sistemas para tratamiento de aguas residuales de película biológica está limitada por diferentes fenómenos. El sustrato (donadores y aceptores de electrones) y los nutrientes necesitan ser transportados del agua residual a la película biológica donde se lleva a cabo la reacción. Los productos, excepto la biomasa, tienen que ser expulsados de la célula (*Harremoës*, 1978). Los fenómenos involucrados son:

- Transporte de nutrientes del agua residual a la película biológica
- Difusión de las moléculas nutritivas hacia la célula, a través de la película líquida que se forma sobre la película biológica
- Fijación de nutrientes en la superficie celular
- Hidrólisis de las moléculas fijadas
- Transporte activo, por medio de transferasas, hasta los centros de procesamiento
- Asimilación de sustratos y nutrientes por medio de reacciones enzimáticas. Este último paso es el más lento del proceso, por tanto, es el que controla la rapidez global de la reacción. El proceso degradativo por medio del cual se elimina la materia orgánica de las aguas residuales puede describirse por medio de la teoría de *Michaelis y Menten*, ya que el paso que controla la rapidez de este, es la reacción enzimática (*Segel*, 1975).

6.1 Ecuación de Michaelis y Menten

El primer modelo para describir la degradación enzimática fue propuesto por *Henri* en 1930. Dicho modelo considera que la rapidez inicial de la reacción es directamente proporcional a la concentración de enzima, incrementándose de manera no lineal con el incremento de la concentración de sustrato, hasta alcanzarse la rapidez máxima limitante. La ecuación de *Henri* está basada en los siguientes postulados (*Segel*, 1975):

- La enzima es un catalizador (propuesto en 1835 por *Berzelius*)
- La enzima y el sustrato reaccionan rápidamente para formar un complejo enzima-sustrato (propuesto en 1920 por *Brown*)
- Solamente se involucran un sustrato y un complejo enzima-sustrato; este complejo se rompe para formar enzima libre y producto
- La enzima, el sustrato y el complejo enzima-sustrato están en equilibrio; esto significa que la rapidez con la cual el complejo enzima-sustrato se disocia a enzima y producto es más rápida que la velocidad con la cual el complejo enzima-sustrato se rompe para formar enzima y producto
- La concentración de sustrato es mucho mayor que la concentración de enzima, la formación del complejo enzima-sustrato no altera la concentración de sustrato
- La rapidez global de la reacción está limitada por la ruptura del complejo enzima-sustrato para formar enzima libre y producto
- La rapidez se mide durante las primeras etapas de la reacción considerando que la reacción inversa es insignificante.

La reacción global puede escribirse



donde

E enzima total (libre y combinada)

S sustrato
 ES complejo enzima-sustrato
 P producto

k_s , k_{-s} y k_p = constantes de rapidez de la reacción.

La ecuación obtenida basándose en los postulados anteriores es

$$v = \frac{K[S]}{1 + \frac{[S]}{K_s}} \quad (6.2)$$

donde

[S] concentración de sustrato

v rapidez inicial de la reacción. Durante v la aparición del producto es lineal con respecto al tiempo; asimismo, no se utiliza más del 5 por ciento del sustrato

K_s constante de disociación del complejo ES

$$= k_{-1}/k_1 = [E][S] / [ES]$$

K constante característica de la enzima

$$= k_p [E]_t / k_s, \text{ donde } [E]_t \text{ es la concentración total de enzima}$$

$$[E]_t = [E] + [ES]$$

Diez años más tarde *Michaelis y Menten* confirmaron el trabajo experimental de *Henri* y presentaron una versión ligeramente modificada de la ecuación original (*Segel*, 1975). La formulación de esta teoría se basa en la ec 6.1; partiendo de esta se hace un balance de masa que expresa la distribución de enzima total $[E]_t$

$$[E]_t = [E] + [ES] \quad (6.3)$$

La rapidez inicial es igual a las concentraciones de todos los productos formados, cada uno multiplicado por su constante de reacción. Cuando solamente hay una especie formadora de producto [ES], la ecuación es

$$v = k_p [ES] \quad (6.4)$$

Dividiendo la ec 6.4 entre la 6.3 se genera la 6.5

$$\frac{v}{[E]_t} = \frac{k_p [ES]}{[E] + [ES]} \quad (6.5)$$

Si se expresa la concentración de cada especie enzimática en términos de enzima libre es necesario reorganizar las expresiones para los diferentes equilibrios

$$k_s = \frac{[E][S]}{[ES]} \quad \text{por tanto, } [ES] = \frac{[S]}{k_s} [E] \quad (6.6)$$

Sustituyendo la ecuación 6.6 en la 6.5

$$\frac{v}{[E]_t} = \frac{k_p \frac{[S]}{k_s} [E]}{[E] + \frac{[S]}{k_s} [E]} \quad (6.7)$$

Cancelando [E] y denominando a $k_p [E]_t$ como $V_{\text{máx}}$

$$\frac{v}{V_{\text{máx}}} = \frac{\frac{[S]}{k_s}}{1 + \frac{[S]}{k_s}} \quad (6.8)$$

La ec 6.8 puede convertirse a la forma usual de la ecuación de *Michaelis y Menten* multiplicando el numerador y el denominador del segundo término de la ec por k_s

$$\frac{v}{V_{\text{máx}}} = \frac{[S]}{k_s + [S]} \quad (6.9)$$

En esta ecuación se supone que la concentración de sustrato es mucho mayor que la de la enzima y que solamente se mide la rapidez inicial de las reacciones.

La representación gráfica de la ecuación de *Michaelis y Menten* es una hipérbola en la que se presentan reacciones de primer orden y de orden cero.

Como se observa en la fig 6.1, un aumento de sustrato manteniendo fija la concentración de enzima produce al principio un aumento considerable en la rapidez de la reacción. A medida que aumenta la concentración de sustrato la rapidez de la reacción empieza a dismi-

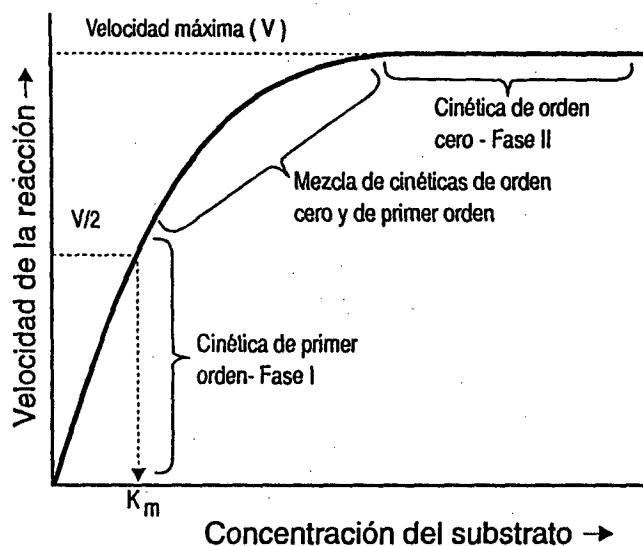


Fig 6.1 Efecto de la concentración de sustrato en la rapidez de reacción
(Conn y Stumpf, 1988)

nuir, produciéndose una reacción de orden mixto. Finalmente, cuando la concentración del sustrato es elevada no se observa cambio en la rapidez. En este punto se alcanza la rapidez máxima de la reacción, efecto que se conoce como saturación enzimática; una vez que se ha alcanzado, la rapidez de la reacción es independiente de la concentración de sustrato.

En la parte lineal de la curva, los sitios activos de las enzimas no están saturados con el sustrato. A medida que aumenta el número de las moléculas de sustrato, dichos sitios se van cubriendo cada vez en mayor grado hasta que, en el punto de saturación, no queda ninguno disponible (reacción de orden cero): la enzima trabaja a su máxima capacidad.

6.2 Ecuación de Lineweaver y Burk

En 1934 *Lineweaver* y *Burk* propusieron un método simplificado para determinar los valores de los coeficientes a partir del modelo de *Michaelis* y *Menten*. Mostraron que si se usan los recíprocos de la ec 6.9 se tiene

$$\frac{1}{V} = \frac{k_s}{V_{\text{máx}}} + \frac{1}{V_{\text{máx}}} \frac{1}{[S]} \quad (6.10)$$

De donde se obtiene la ecuación de *Lineweaver-Burk*

$$\frac{1}{V} = \frac{[S]}{V_{\text{máx}} [S]} + \frac{k_s}{V_{\text{máx}} [S]} \quad (6.11)$$

Si se representa gráficamente $1/V$ en función de $1/[S]$, se obtiene una línea recta, la cual se muestra en la fig 6.2.

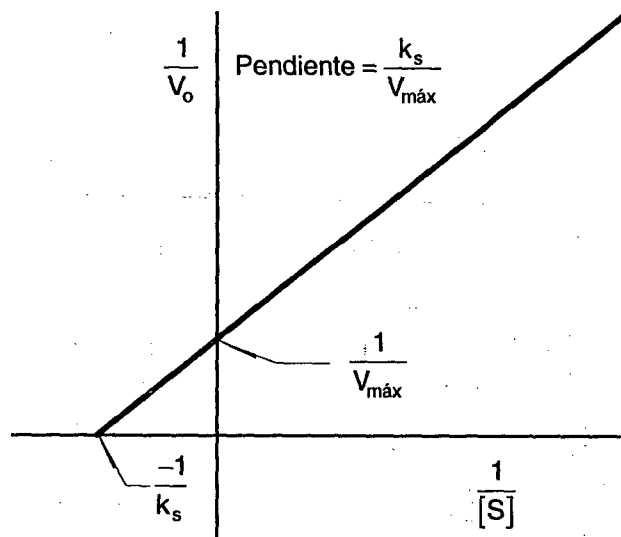


Fig 6.2 Forma linealizada de la ecuación de Michaelis y Menten (Lenninger, 1976)

A partir de esta gráfica es posible obtener las constantes de *Michaelis y Menten* y la rapidez máxima del proceso ($V_{\text{máx}}$), ya que la pendiente es igual a $k_s / V_{\text{máx}}$, el punto de intersección con la ordenada al origen es igual a $1/V_{\text{máx}}$ y el punto de intersección con el lado negativo de la abscisa es igual a $-1/k_s$.

7. MATERIAL Y MÉTODO

Para determinar las constantes cinéticas en películas biológicas se utilizó un respirómetro *Warburg* modificado que permite determinar las curvas de consumo de oxígeno (DBO). En los experimentos se utilizaron películas biológicas generadas en la primera y tercera etapas del biodisco que se encuentra en la planta para tratamiento de aguas residuales de Ciudad Universitaria. Los sustratos utilizados en los experimentos con biopelículas que eliminan material carbonoso fueron acetato de sodio, glucosa y aguas residuales. Para los experimentos con biopelículas nitrificantes se emplearon cloruro de amonio y agua de la tercera etapa del sistema de biodisco. La determinación de los parámetros cinéticos k_s y $V_{m\acute{a}x}$, se realizó con base en el modelo propuesto por *Michaelis y Menten*.

7.1 Descripción y funcionamiento del respirómetro

La fig 7.1 muestra el diagrama del respirómetro modificado para estudios en biopelículas. El sistema consta de cuatro partes principales: 1) El manómetro, 2) El recipiente con la solución de *Brodie* (prensa), 3) El frasco de reacción y 4) El baño con agua a temperatura constante. La modificación principal se realizó en el frasco de reacción para poder realizar los experimentos. El frasco de reacción y sus partes se muestran con detalle en la fig 7.2.

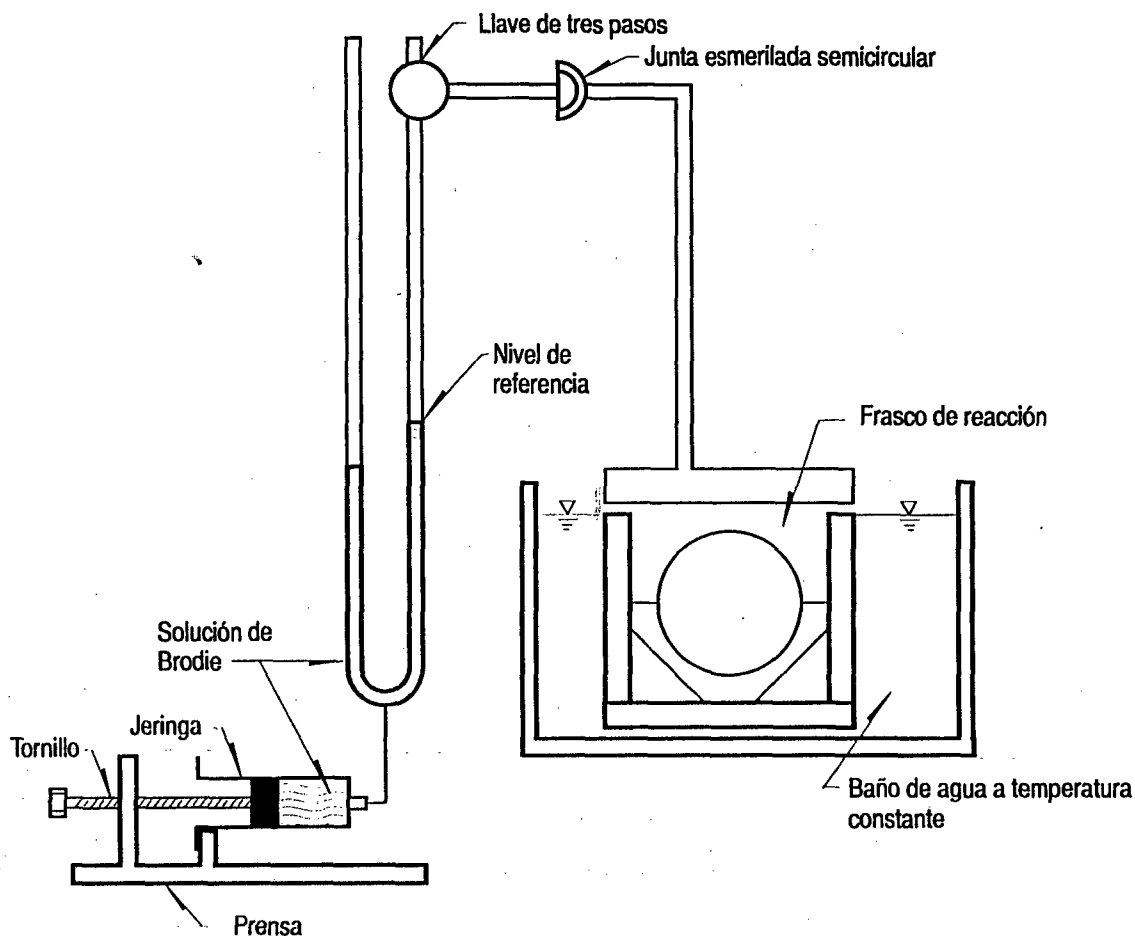


Fig 7.1 Unidad del respirómetro Warburg modificado

Se utilizaron discos de vidrio esmerilado como medio de soporte para el desarrollo de microorganismos; se escogió este tipo de superficie porque permite buena adhesión de los microorganismos a la misma y es inerte al ataque enzimático. Los discos miden 10 cm de diámetro y 3 mm de espesor, en el centro tiene un orificio que sirve para sujetarlos a una flecha sobre la cual pueden girar o sujetarse.

Los frascos de reacción (fig 7.2) están hechos de acrílico; en su parte inferior el recipiente está dividido longitudinalmente en dos: una sirve para colocar la solución con sustrato y la otra proporciona el espacio necesario para que gire un magneto incluido en la flecha de los discos esmerilados. Al introducirse el disco queda colocado de tal forma que la película biológica se sumerge en la solución nutritiva aproximadamente en 40 por ciento de su

superficie. En la parte superior interna se colocó un soporte que se utiliza como contenedor de hidróxido de potasio para absorber el anhídrido carbónico producido por los microorganismos.

En la tapa de los frascos de reacción hay cuatro perforaciones; dos sirven para colocar tornillos que sujetan la tapa al recipiente, una tercera sirve para conectar el recipiente al equipo de medición y la última tiene un tapón para introducir la solución con sustrato.

Cada uno de los frascos está conectado a un manómetro de 40 cm de longitud, por medio de una junta esmerilada semiesférica. En la parte inferior del manómetro se ajustó una jeringa como recipiente para la solución *Brodie*. El émbolo de la jeringa se acciona por una pequeña prensa de tornillo lo que permite mover su émbolo y así ajustar los niveles del líquido en el manómetro.

El sistema de tracción consiste en seis poleas de aluminio colocadas en forma vertical y separadas entre ellas 20 cm de centro a centro. Sobre cada polea se fijó un magneto permanente para que al girar las poleas por medio de una banda accionada por un motor de velocidad variable, alimentado por una fuente de poder, impulsen a los magnetos acoplados a la flecha dentro del recipiente.

El funcionamiento del sistema es similar al descrito en el inciso 5.3.1; la función principal es entonces, la medición de la diferencia de presión originada por la disminución de la cantidad de oxígeno en el frasco de reacción.

La toma de lecturas se hace ajustando el nivel de solución *Brodie* por medio de la prensa de tornillo hasta la marca de referencia; la lectura se realiza en el lado izquierdo del manómetro. La toma de lecturas se hizo cada 5 minutos y el periodo durante el cual se hicieron las lecturas se determinó con base en trabajos anteriores (*González y Díaz, 1987* y *Göbel-Meurer, 1979*); el principal criterio para la determinación del tiempo de degradación es la complejidad estructural del sustrato.

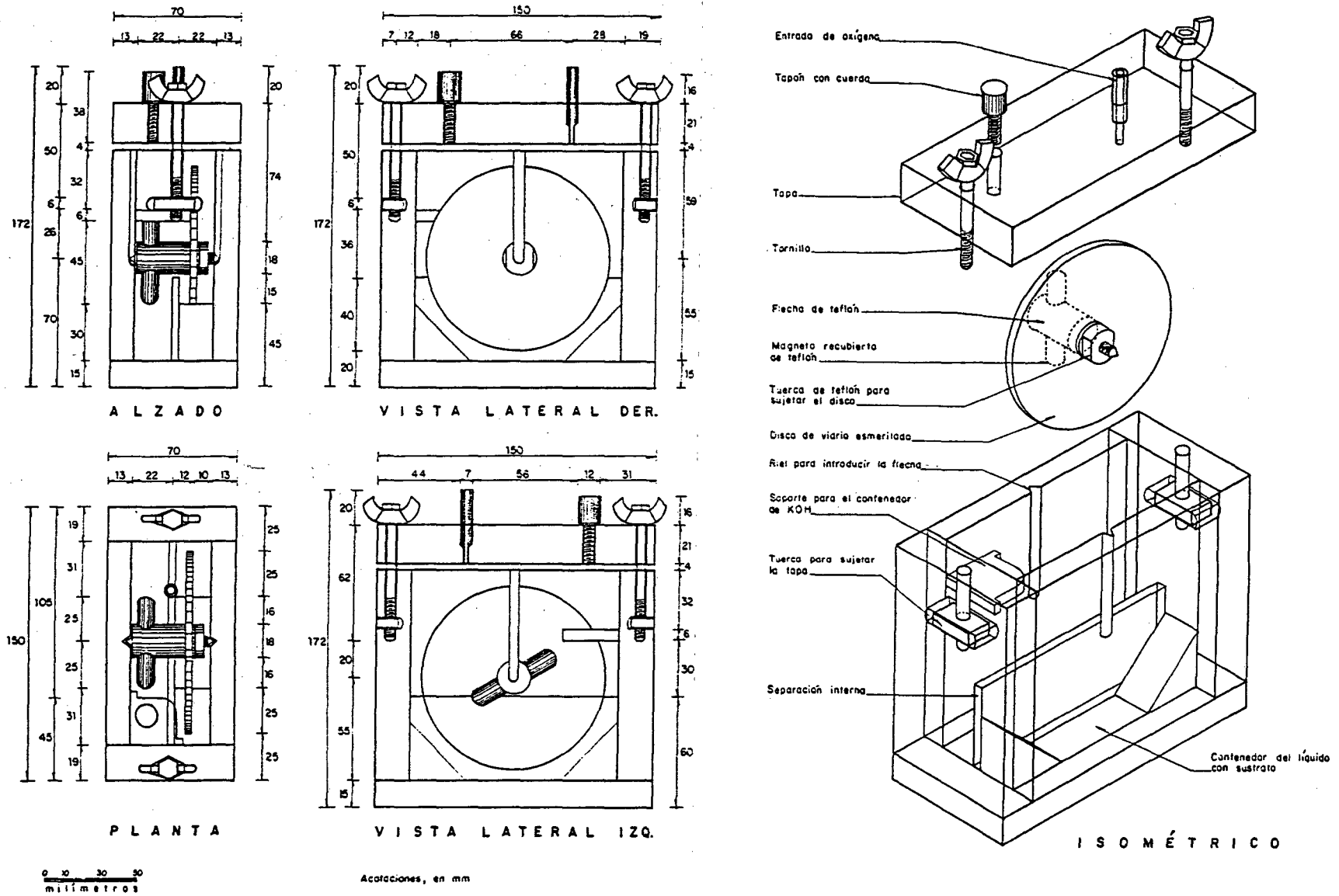


Fig 7.2 Estructura y dimensiones de los frascos del respirómetro Warburg

7.2 Condiciones de operación del sistema

7.2.1 Temperatura

La mayoría de los organismos presentes en las aguas de desecho se desarrollan aproximadamente a 20 °C, por lo que se eligió esta temperatura para evitar que los microorganismos sufran cambios ambientales drásticos que afecten su metabolismo. Temperaturas menores a este rango afectan los sistemas de transporte membranar, disminuyendo la rapidez de difusión de sustratos, lo que impide que los sustratos puedan entrar rápidamente a la célula, dando como resultado una baja rapidez de crecimiento. Con el incremento de la temperatura los lípidos de la membrana pueden fundirse, causando una pérdida de la integridad estructural de la membrana, lo que provoca a su vez la fuga de contenidos celulares. Por otro lado, si se incrementa la temperatura se induce a que la reacción se lleve a cabo rápidamente, lo que podría dificultar una definición clara de las distintas etapas de degradación de cada uno de los sustratos.

Con objeto de evitar que temperaturas cambiantes influyeran sobre la experimentación, los frascos se mantuvieron a temperatura constante por inmersión en un baño de agua. La temperatura se mantuvo constante a 20 °C por medio de un termostato semisumergible. De esta forma se evitó que la temperatura se convirtiera en una variable más dentro de la experimentación.

7.2.2 pH

El valor de pH se ajustó a 7.2 por medio de una solución amortiguadora de fosfato (monobásico y dibásico de potasio) en la que se solubilizó el sustrato.

Dos soluciones de las sales de fosfato se presentan en cantidades iguales y se van combinando hasta alcanzar el valor de pH deseado. La cantidad de fosfatos en cada solución dependerá de la capacidad de amortiguar que se desee. Se eligió este valor de pH considerando que las aguas residuales de origen municipal tienen valores neutros y que la

mayoría de los organismos tienen un pH óptimo cercano a la neutralidad. Valores de pH mayores o menores a los señalados afectan principalmente la actividad enzimática, puesto que cada enzima es activa en un rango específico de valores de pH.

7.3 Generación y caracterización de las películas biológicas

Las películas biológicas se generaron en el biodisco de la planta para tratamiento de aguas residuales de Ciudad Universitaria al fijar, por medio de soportes, los discos de vidrio esmerilado al material plástico del biodisco. Los discos, entonces, estaban sujetos a las mismas condiciones que el material plástico del biodisco. Se considera que la biopelícula que se desarrolló sobre los discos de vidrio tenía la misma composición que la del biodisco.

Para realizar el trabajo en el respirómetro se retiraban seis discos de vidrio del biodisco y se llevaban al laboratorio. Cuando las determinaciones no eran destructivas, los discos de vidrio se colocaban nuevamente en el biodisco al terminar la experimentación. En todos los casos se seleccionaban los discos de vidrio que tuvieran el mismo tiempo de estar expuestos al agua residual.

Para la generación de películas que eliminan material carbonoso los discos se colocaron en la primera etapa del biodisco durante un periodo de 3 a 5 días. Para películas nitrificantes los discos se colocaron en la tercera etapa del sistema durante dos semanas aproximadamente.

El espesor de la película biológica se midió por medio de un microscopio óptico. Se enfoca la superficie de la biopelícula y, posteriormente, se pone en foco la superficie del disco de vidrio. La diferencia se lee en el tornillo macrométrico del microscopio. La cantidad de biomasa se determinó por medio de sólidos suspendidos totales y nitrógeno *Kjeldalh* por unidad de superficie (APHA/AWWA/WPCF, 1985).

7.4 Obtención del volumen de los frascos de reacción y de las constantes de los frascos

Para conocer el valor de consumo de oxígeno durante la degradación de un sustrato es necesario determinar el valor de k o constante de los frascos de reacción. Este valor se determinó a partir de la ec 5.2. Resolviendo el segundo producto de esta y considerando que V_R es igual a V_f , ya que el volumen de microorganismos es mínimo, se tiene

$$k = 0.143 [(V_g / V_f)(273 / T) + \alpha O_2] \quad (7.1)$$

Con la ec 7.1 se determinan los valores para las constantes de cada uno de los frascos. Al valor de V_g (volumen de gas dentro del frasco de reacción más el volumen del manómetro hasta la marca de referencia) se le restaron los valores de los volúmenes de la solución con sustrato y del disco y la flecha.

Los valores obtenidos para las constantes de los frascos de reacción se muestran en la tabla 7.1.

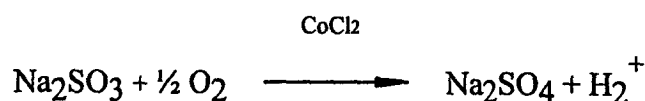
Tabla 7.1
Valores de las constantes de los frascos
de reacción obtenidos a 18 y 20 °C

Número de frasco	Temperatura (°C)	
	18	20
1	0.8664	0.8603
2	0.9070	0.9006
3	0.8245	0.8187
4	0.8864	0.8802
5	0.8649	0.8588

La obtención de la cantidad de oxígeno utilizado durante la degradación del sustrato presente se realizó utilizando la ec 5.1, en la cual se sustituyeron los valores de las constantes de los frascos de reacción.

7.5 Verificación del sistema

Antes de realizar corridas utilizando películas biológicas se verificó que el respirómetro *Warburg* funcionara adecuadamente. Con este fin se hicieron corridas usando sulfito de sodio en presencia de cloruro de cobalto. Se usó este compuesto por ser fácilmente oxidable al estar disuelto en agua y en presencia de oxígeno molecular (*Quintero*, 1981). La reacción es



Por medio del respirómetro se comprobó que la cantidad medida de oxígeno consumido para llevar a cabo la reacción corresponde con la cantidad teórica.

7.6 Sustratos utilizados

Las corridas iniciales con películas biológicas se hicieron con sustratos de fácil degradación: acetato de sodio y glucosa. El acetato es tomado por las células y, sin transformaciones, es introducido al Ciclo de los Ácidos Tricarboxílicos para ser descarboxilado rápidamente. La glucosa es degradada por la glucólisis hasta llegar a piruvato, con la obtención de energía en forma de ATP. Posteriormente, es transformada a acetato para sufrir el mismo proceso que el acetato. Estas dos moléculas son utilizadas comúnmente ya que su oxidación en la fosforilación oxidativa es altamente eficiente y los consumos de oxígeno reales son muy cercanos a los teóricos (*Göbel-Meurer*, 1979). Las concentraciones de acetato de sodio utilizadas fueron 36, 108, 145, y las de glucosa de 100, 200, 300 mg/l por corresponder con valores comunes de demanda química de oxígeno (DQO) en aguas residuales municipales. Una vez determinada la cinética de eliminación de los sustratos anteriores se utilizó como sustrato el agua residual que llega al biodisco de la planta para tratamiento de Ciudad Universitaria. La concentración de contaminantes se cuantificó por medio de la DQO (*APHA/AWWA/WPCF*, 1985).

Para la determinación de la cinética de eliminación de material nitrogenado, se emplearon como sustratos cloruro de amonio y aguas tratadas de la tercera etapa del biodisco. El cloruro de amonio se utilizó como alimento (donador de protones) de las bacterias nitrificantes; las concentraciones utilizadas fueron 5, 10 y 20 mg N/l las cuales se eligieron con base en los trabajos realizados por Göbel-Meurer (1979). La cantidad de amoniaco presente en las aguas de desecho se determinó por medio de dilatación (APHA/AWWA/WPCF, 1985).

7.7 Determinaciones de la cinética de consumo de sustratos

Para determinar la cinética de eliminación de sustratos a través del método propuesto por Lineaweaver y Burk, es necesario trabajar con un mínimo de tres concentraciones de sustrato diferentes. Por este motivo, se dispusieron de cuatro frascos de reacción para la medición de la respiración de sustratos, un frasco más con solución amortiguadora sin sustrato (para cuantificar la respiración endógena) un último frasco con agua destilada y sin película biológica sirvió como termobarómetro para compensar los cambios originados por las diferencias de presión atmosférica y temperatura. En todos los frascos el volumen total de solución fue de 65 ml.

Antes de cada serie de mediciones fue necesario lavar las películas biológicas durante una hora con solución amortiguadora para eliminar el material contaminante que pudiera servir como alimento exógeno de las bacterias.

Los cálculos de los valores de consumo de oxígeno se realizaron utilizando un programa de hoja de cálculo (Lotus 123) para la computadora.

Para la derterminación de la cinética de eliminación de sustratos se trabajó con los valores netos de respiración, estos se obtuvieron restando la respiración endógena a la respiración total o combinada.

La obtención de las constantes cinéticas se hizo por medio de métodos gráficos. Inicialmente se graficó el consumo de oxígeno para cada uno de los sustratos contra el tiempo; a partir de estas gráficas se obtuvo el consumo final de oxígeno y la rapidez inicial de degradación para cada una de las concentraciones utilizadas. Con los valores de rapidez obtenidos de las gráficas se determinaron las constantes: rapidez máxima de degradación ($V_{\text{máx}}$) y constante de *Michaelis y Menten* (k_s), con base en el método propuesto por *Lineaweaver y Burk*.

El consumo específico de oxígeno para cada sustrato se obtiene graficando el valor de consumo final de oxígeno (CFO) contra las concentraciones de sustrato iniciales. El producto debe ser una línea recta cuya pendiente es el valor de consumo específico de oxígeno (mg oxígeno/mg sustrato).

Los resultados son producto de la utilización de análisis de regresión lineal.

8. RESULTADOS

8.1 Verificación de la operación del sistema

Utilizando tres concentraciones de sulfito de sodio en el respirómetro se obtuvieron las curvas de la fig 8.1.

La fig 8.1 muestra los valores de oxígeno consumido para la oxidación de sulfito de sodio contra el tiempo. Después de aproximadamente 60 minutos el sulfito de sodio en los tres frascos de reacción había sido oxidado completamente. La tabla 8.1 señala los valores experimentales y teóricos del consumo final de oxígeno (CFO).

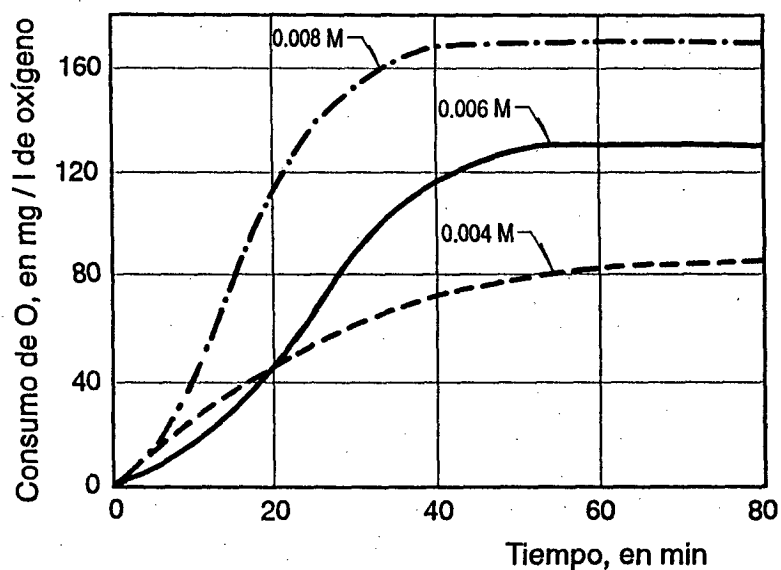


Fig 8.1 Consumo de oxígeno para sulfito de sodio

En la tabla 8.1 se puede observar que los valores teóricos y los experimentales difieren entre 8 y 10 por ciento, siendo estos últimos, en todos los casos, inferiores. Tomando en cuenta este hecho, se realizó la prueba de la demanda química de oxígeno (DQO) para conocer la cantidad real de sulfito de sodio oxidable. De esta prueba se obtuvo que el 7.95 por ciento del reactivo no es oxidable debido a impurezas no reportadas en el análisis del laboratorio proveedor; este valor es adicional al 1.8 por ciento de impurezas reportadas (98.2 por ciento de pureza).

Tabla 8.1 Consumo de oxígeno para sulfito de sodio

Concentración de sulfito de sodio (g mol / l)	CFO (mg de O ₂ / l)	
	Valores experimentales	Valores teóricos*
0.004	87	96
0.006	133	144
0.008	173	192

* Los resultados anteriores consideran que, según el fabricante, el sulfito de sodio tiene una pureza de 98.2%

Si se resta el 7.95 por ciento al valor teórico, la diferencia entre los valores teóricos y experimentales es de 1 a 3 mg de O₂/l (ver tabla 8.2).

Tabla 8.2 Consumo de oxígeno para sulfito de sodio

Concentración de sulfito de sodio (g mol / l)	CFO (mg de O ₂ / l)	
	Valores experimentales	Valores teóricos
0.004	87	88
0.006	133	132
0.008	173	176

A partir de los resultados de la tabla 8.2 se determinó que los valores obtenidos con el respirómetro *Warburg* tiene un nivel de confianza de 98 por ciento, por tanto, se considera que son confiables.

8.2 Cinética de consumo de sustratos orgánicos

Las figs 8.2, 8.3 y 8.4 muestran los resultados de la respiración de tres sustratos orgánicos: acetato de sodio, glucosa y aguas residuales de Ciudad Universitaria. Cada figura señala curvas correspondientes al consumo total o combinado de oxígeno durante la degradación bioquímica de soluciones con diferentes concentraciones.

En las figs 8.2 a 8.4 se observa un comportamiento similar en el cual la respiración endógena siempre está por debajo de la respiración total o combinada. Los valores de consumo final de oxígeno aumentan con el valor de concentración inicial de sustrato. Los valores de respiración endógena varían entre el 30 por ciento de la respiración combinada durante la respiración de aguas residuales de CU hasta el 70 por ciento, como en el caso de la respiración de glucosa. En el caso de la respiración de acetato de sodio, la respiración endógena tiene valores entre el 40 y 50 por ciento de la respiración combinada.

Las figs 8.5, 8.6 y 8.7 muestran las curvas de la respiración de los tres sustratos orgánicos utilizados después de haber restado la respiración endógena. Las curvas obtenidas indican únicamente la cantidad de oxígeno requerida para la degradación de los sustratos puros.

Estas tres figuras muestran claramente el comportamiento de la respiración de los sustratos sin la influencia de la respiración endógena. En la fig 8.5 se puede observar que las pendientes de las curvas al inicio del experimento son prácticamente iguales. El tiempo requerido para terminar la degradación de la concentración más baja es de, aproximadamente 15 minutos. El valor del consumo final de oxígeno se mantiene sin grandes cambios, comparado con las otras dos concentraciones.

Las pendientes iniciales de las curvas correspondientes a las concentraciones de 108 y 145 mg/l continúan casi paralelas, siendo la pendiente de la menor concentración, ligeramente menor que la otra.

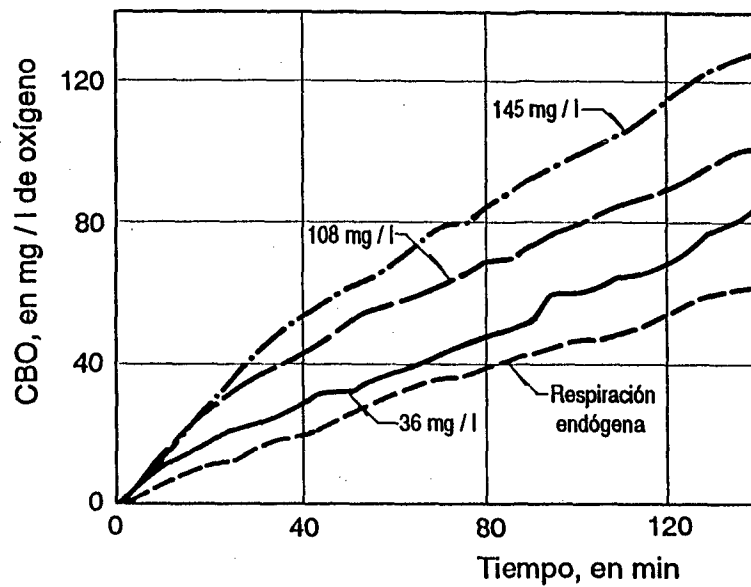


Fig 8.2 Consumo bioquímico de oxígeno para acetato de sodio

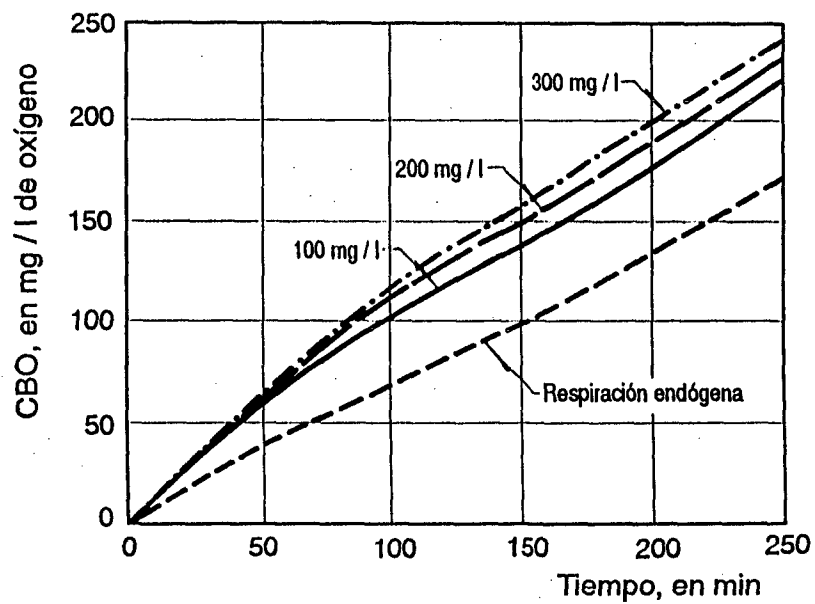


Fig 8.3 Consumo bioquímico de oxígeno para glucosa

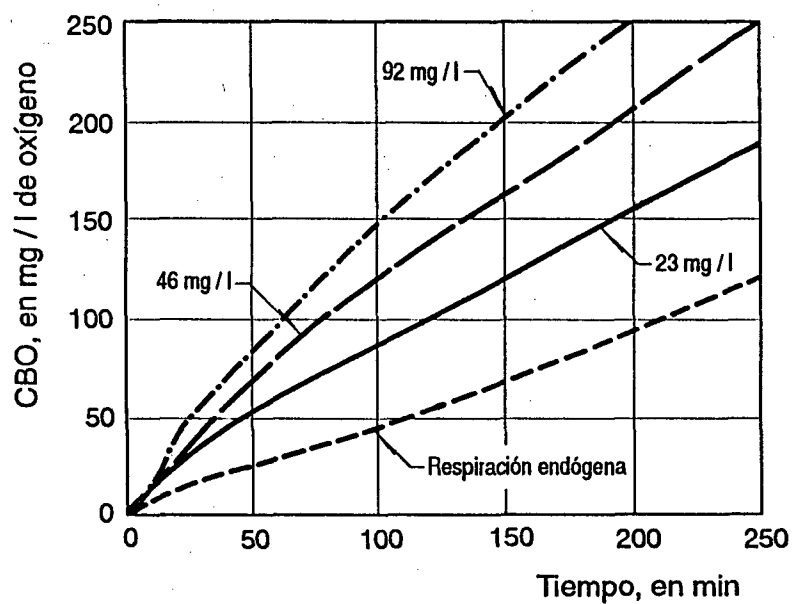


Fig 8.4 Consumo bioquímico de oxígeno para aguas residuales de CU

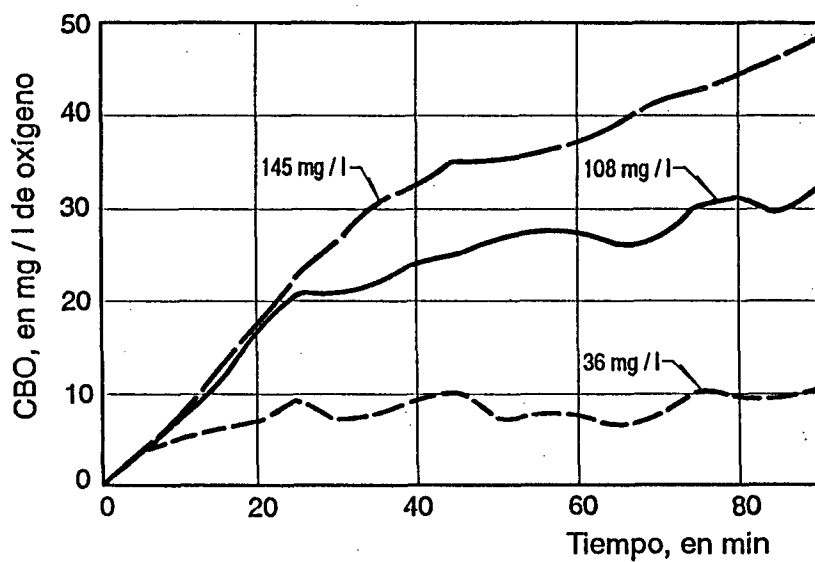


Fig 8.5 Consumo bioquímico de oxígeno para acetato de sodio

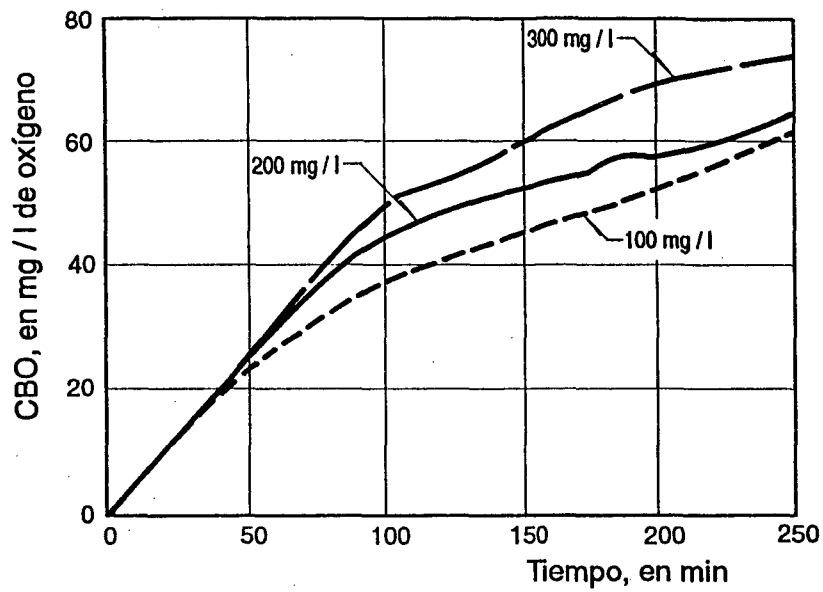


Fig 8.6 Consumo bioquímico de oxígeno para glucosa

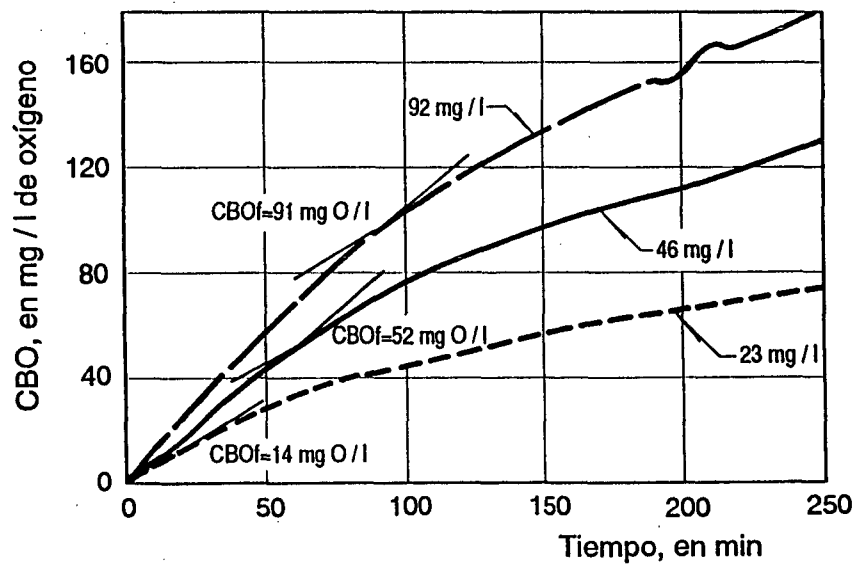


Fig 8.7 Consumo bioquímico de oxígeno utilizando aguas residuales de CU

En la fig 8.6 se puede observar que las pendientes iniciales de las tres curvas son iguales hasta los 50 minutos, donde la menor de las concentraciones se separa, considerándose concluida la respiración de la concentración inferior. Las otras dos curvas continúan hasta que termina la respiración de cada una de ellas.

En su parte inicial, las curvas presentan una pendiente similar. Durante este tiempo los microorganismos cuentan con la cantidad (concentración) de sustrato necesaria para funcionar a su máxima capacidad respiratoria cubriendo todos los sitios activos de las enzimas que participan en la degradación (reacción de orden cero); una vez que la concentración del sustrato disminuye y no es suficiente para cubrir los sitios, se presenta una disminución en la pendiente al observarse un descenso en la respiración (*Conn y Stumpf, 1988*).

En la fig 8.7 se observa que las tres curvas tienen pendientes diferentes desde el principio del experimento. En este caso las pendientes iniciales aparentan ser proporcionales a la concentración de material orgánico presente. Debido a que las aguas residuales contienen una mezcla de sustancias con muy diversas características químicas, las curvas no muestran claramente los pasos de la degradación ya que, entonces, se habla de una degradación secuencial de las sustancias, haciendo difícil la identificación del paso entre la terminación de la respiración de sustrato y la respiración endógena.

Desde el punto de vista teórico, el punto en el que se alcanza la asíntota de la curva corresponde al valor de consumo bioquímico de oxígeno final (CBO_f). En este punto las células agotaron el sustrato presente. La estimación de este punto se basa en observaciones de las curvas. Considerando que cuando se alcanza el valor para CBO_f , se ha agotado el sustrato, es de suponerse la pendiente de las curvas se sigue incrementando. Dicho incremento refleja el consumo de oxígeno requerido para la degradación de sustratos endógenos los cuales son producto previamente administrados. Este comportamiento es más evidente en las gráficas obtenidas durante la degradación de glucosa y aguas residuales.

La tabla 8.3 resume los resultados de las gráficas 8.2 a 8.7

Tabla 8.3 Valores de consumo final de oxígeno y de rapidez de degradación

Sustrato	Concentración inicial (mg / l)	CBO _f (mg O ₂ / l)	Rapidez inicial de consumo (mg O ₂ / l min)	Coefficiente de correlación
Acetato de sodio	36	9.44	0.68	1
	108	24.08	0.83	0.994
	145	35.12	0.90	0.993
Glucosa	100	31.11	0.45	0.993
	200	52.47	0.49	0.997
	300	71.28	0.52	0.997
Aguas residuales	23	13.91	0.55	0.993
	46	51.62	0.87	0.997
	92	91.03	1.14	0.994

En la tabla 8.3 se puede señalar que cuando se utilizaron aguas residuales los valores de consumo de oxígeno obtenidos con el respirómetro tiene valores aproximadamente iguales a los valores de DQO. En el caso de la concentración intermedia (46 mg/l), el valor de CBO_f resultó ligeramente mayor que la DQO. Teóricamente estos últimos deberían superar a los primeros. Si se observan las curvas de la fig 8.7, se nota la dificultad para seleccionar el punto de inflexión entre la terminación de la respiración de sustrato y la respiración endógena continuada. Si a esta problemática se le añade el error experimental y la consideración de que, aunque las biopelículas fueron generadas bajo las mismas condiciones, al observarlas al microscopio se detectan diferencias entre los diversos discos. Por este motivo, es necesario considerar que discrepancias estructurales, aunque pequeñas, entre las biopelículas de los diferentes discos, son hechos importantes que deben ser considerados en la interpretación de resultados.

8.2.1 Obtención del consumo específico de oxígeno para la degradación de material carbonoso

Graficando los valores finales de consumo de oxígeno (tabla 8.3) de cada sustrato contra la concentración inicial de sustrato se obtuvieron las figs 8.8 a la 8.10. El valor del consumo específico de oxígeno (CEO) corresponde a la pendiente de cada una de las rectas.

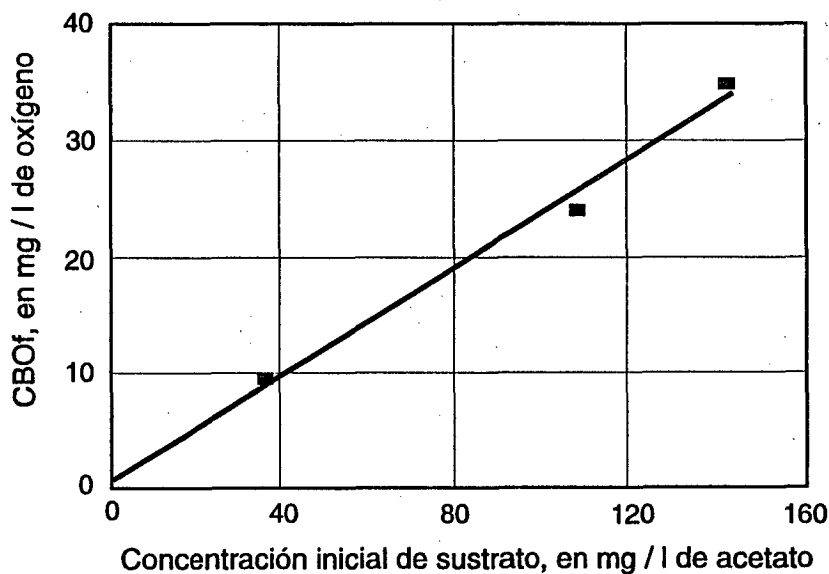


Fig 8.8 Obtención del consumo específico de oxígeno para acetato de sodio

De la representación gráfica para la obtención del consumo específico de oxígeno (CEO) para cada uno de los sustratos se obtiene una recta en la que se esperaría tener una ordenada al origen en cero o un valor muy próximo a él, puesto que en ausencia de sustrato no hay consumo de oxígeno.

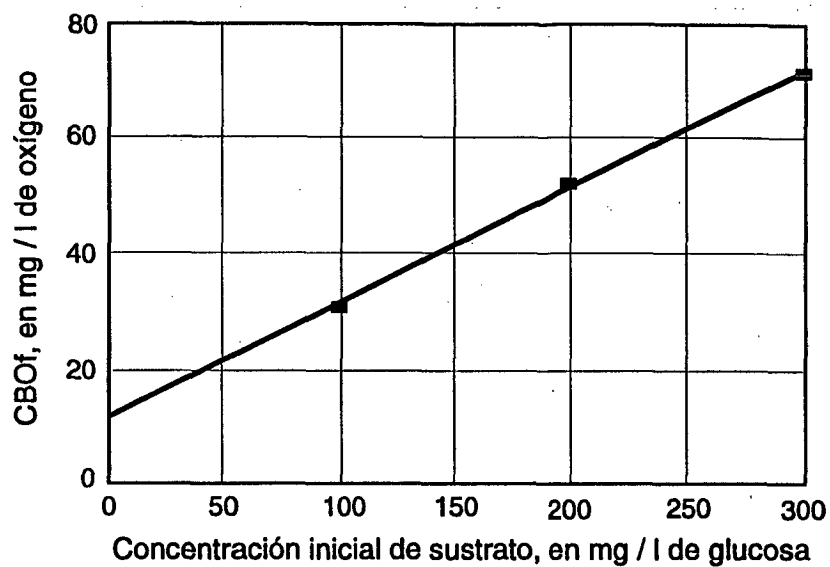


Fig 8.9 Obtención del consumo específico de oxígeno utilizando glucosa

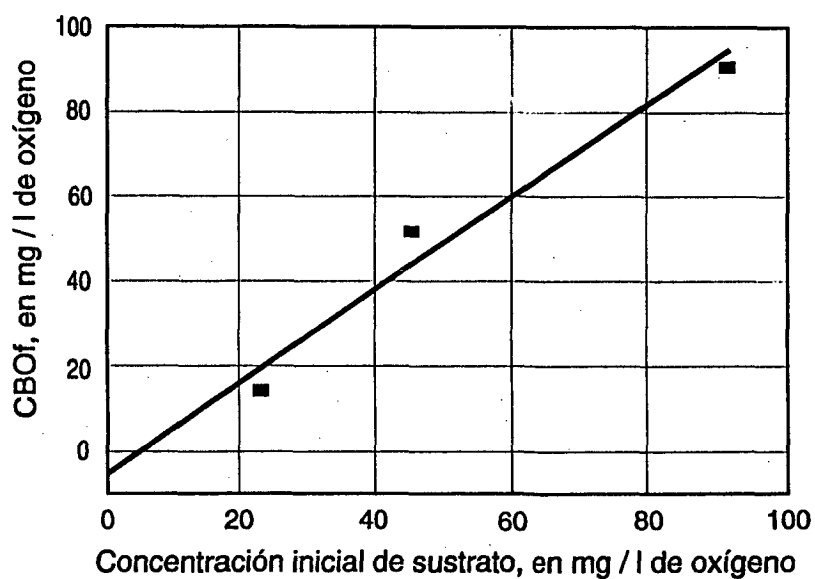


Fig 8.10 Obtención del consumo específico de oxígeno para aguas residuales de CU

La tabla 8.4 muestra los resultados obtenidos a partir de las gráficas 8.8 a 8.10.

Tabla 8.4 Valores de consumo específico de oxígeno

Sustrato	CEO teórico (mg O ₂ / mg S)	CEO experimental (mg O ₂ / mg S)	Ordenada al origen (mg O ₂ / l)	Coefficiente de correlación
Acetato de sodio	0.975	0.23	0.53	0.988
Glucosa	1.06	0.20	11.45	0.998
Aguas residuales	-	1.08	-5.8	0.968

De acuerdo con los resultados obtenidos la ordenada al origen para acetatos de sodio y glucosa es superior a cero. Göbel-Meurer (1979) y Peters (1979) proponen que el consumo de oxígeno diferente a cero (tabla 8.4), indicado por la ordenada al origen se debe al consumo de oxígeno requerido para la síntesis de las enzimas implicadas en el proceso de degradación del sustrato involucrado. Esta explicación es factible para la degradación de acetato de sodio y glucosa, ya que la célula no está adaptada a la degradación de sustratos en condiciones puras, por consiguiente, requiere un periodo de síntesis enzimática. Sin embargo, para la degradación de aguas residuales, los microorganismos de los sistemas para tratamiento cuentan con un complejo sistema enzimático acondicionado para llevar a cabo la asimilación de este tipo de sustrato. En este caso, el valor de la ordenada al origen es inferior de cero, lo cual se puede atribuir a diferencias de las características entre cada una de las películas utilizadas y a los procedimientos experimentales. Esto se puede deber a diferencias poblacionales que suceden durante la generación de la biopelícula y que contribuyen con los errores experimentales; estas diferencias se confirmaron cuando se realizaron observaciones microscópicas con el fin de determinar el grosor de la película biológica; las más evidentes fueron en las poblaciones de nemátodos, rotíferos y protozoarios.

Los valores teóricos de CEO para acetato de sodio y glucosa son 0.975 y 1.06 respectivamente, los cuales son superiores a los valores obtenidos experimentales (tabla 8.4). Esto se debe a que durante el lavado de las películas biológicas, los microorganismos consumen material endógeno (glucógeno, grasas, etc) para su mantenimiento, ya que no cuentan con una

fuelle exógena de nutrientes. El sustrato que se suministra cuando las biopelículas se encuentran en este estado celular, es utilizado por los microorganismos para cubrir necesidades inmediatas (respiración) y con fines de mantenimiento celular (reabastecimiento de sustancias de reserva, síntesis de material celular y material extracapsular, etc; *Schlegel*, 1985). Los procesos mencionados traen como resultado que el sustrato administrado no corresponda con el oxidado, por lo que los valores de respiración exógena son bajos, reflejándose esto en una disminución en la pendiente y por tanto, en el consumo específico de oxígeno. Lo anterior es confirmado por *Painter* (1968) y *Placak y Ruchhoft* (1947) en *Painter* (1983), quienes reportan valores de consumo de oxígeno que, para el caso de la oxidación de glucosa, van de 8 a 31 por ciento del valor teórico esperado.

8.2.2 Obtención de las constantes de *Michaelis* y *Menten* para la degradación de material carbonoso

Graficando los valores de los inversos de velocidad inicial de degradación contra los inversos de las concentraciones de cada uno de los sustratos, se obtienen las figs 8.11, 8.12 y 8.13.

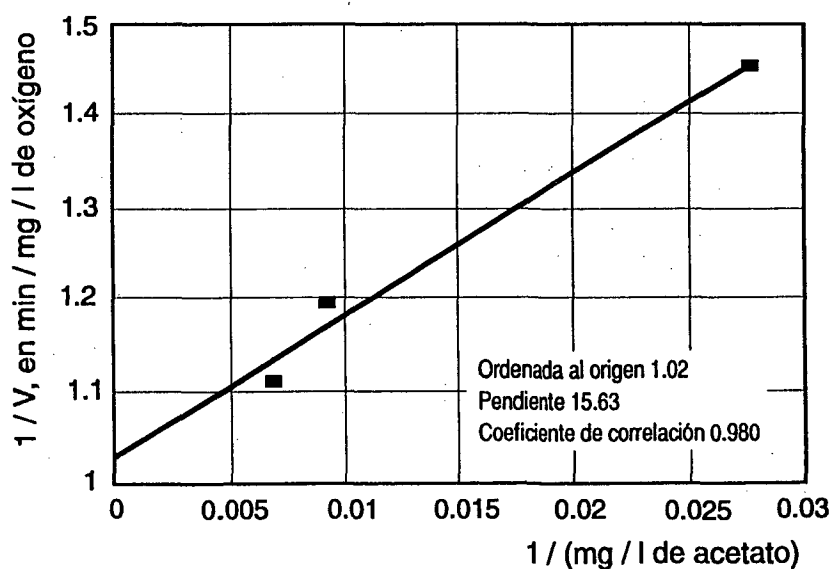


Fig 8.11 Linearización de Lineaweaver y Burk utilizando glucosa

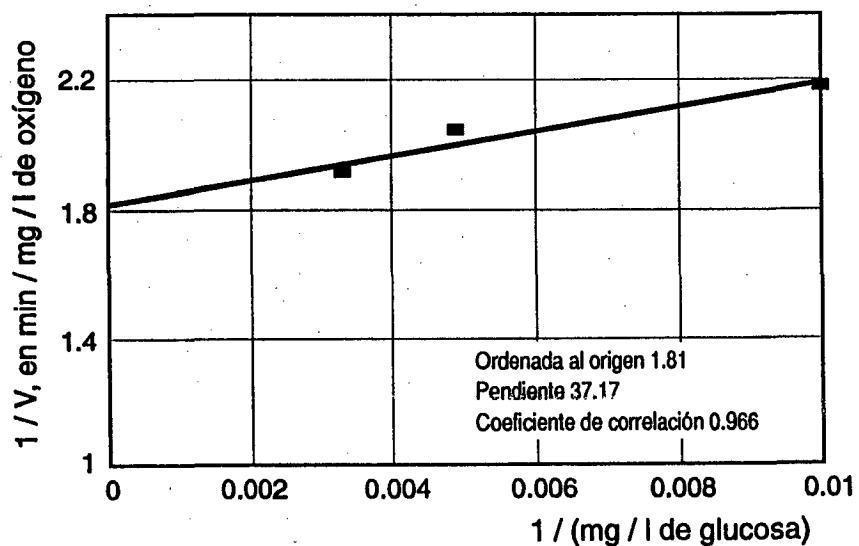


Fig 8.12 Linearización de Lineawcaver y Burk utilizando glucosa

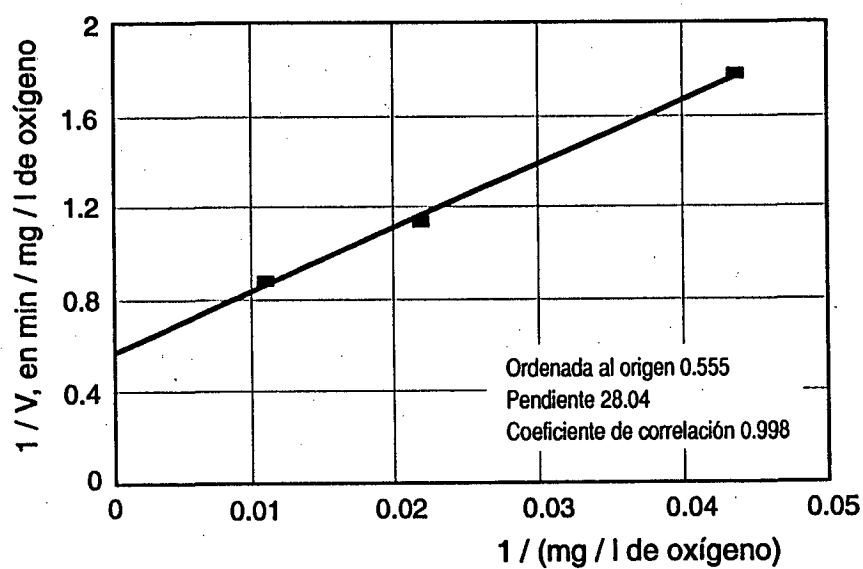


Fig 8.13 Linearización de Lineawcaver y Burk utilizando aguas residuales

Los valores de las constantes para los tres sustratos se muestran en la tabla 8.5.

Tabla 8.5 Valores de las constantes de *Michaelis y Menten*

Sustrato	$V_{\text{m}\acute{\text{a}}\text{x}}$ (mg O ₂ /l min)	k_s (mg S/l)	Coefficiente de correlaci3n
Acetato de sodio	0.97	15.51	0.976
Glucosa	0.54	20.43	0.966
Aguas residuales	1.80	50.47	0.998

El valor m1s bajo de k_s se obtuvo utilizando acetato de sodio, lo cual indica una elevada afinidad entre el sustrato y las enzimas implicadas en el proceso de degradaci3n. El ion acetato es introducido directamente, como acetilCoA, en el sistema enzim1tico que se conoce como ciclo de los 1cidos tricarboxilicos o v1a final com1n para la oxidaci3n de carbohidratos, l1pidos y prote1nas; esta es una v1a metab3lica eficiente y universal presente en organismos aerobios. La degradaci3n del compuesto consiste en la separaci3n del sodio y el acetato y la posterior incorporaci3n de este 1ltimo en forma de acetilCoA, a la v1a metab3lica anteriormente mencionada. El valor obtenido para la rapidez m1xima, se encuentra relacionado con la sencillez del proceso de degradaci3n y con k_s .

La degradaci3n de glucosa comienza a partir de la gluc3lisis para ser trasformada en piruvato, el cual es posteriormente trasformado en AcetilCoA e incorporado al ciclo de los 1cidos tricarboxilicos. La utilizaci3n de esta v1a involucra el uso de un mayor n1mero de enzimas que en el caso del acetato de sodio y que, de acuerdo con los resultados obtenidos, tienen menor afinidad por los sustratos producidos durante la gluc3lisis. El empleo de esta v1a implica un incremento en el valor de k_s y una disminuci3n en la rapidez de degradaci3n con respecto a los valores obtenidos para acetato de sodio.

El mayor valor de k_s se obtuvo durante la degradaci3n de aguas residuales. Esto indica que este sustrato es el menos af1n al sistema enzim1tico de los microorganismos; sin embargo, es el que alcanza una mayor rapidez m1xima de degradaci3n ($V_{\text{m}\acute{\text{a}}\text{x}}=1.80$ mg O₂/l·min). Esto se

debe a que los microorganismos están aclimatados para degradar la materia orgánica contenida en las aguas de desecho. *Gils en Painter* (1983), ha encontrado que los aclimatados a cierto tipo de sustrato son capaces de degradarlo más rápidamente que los no aclimatados.

8.2.3 Cuantificación de biomasa

Debido a que la rapidez de degradación está en función de la biomasa presente (*Shieh y Mulcahy*, 1986) se procedió a su cuantificación. Se analizaron tres biopelículas seleccionadas al azar, casos A, B y C. La tabla 8.6 muestra los resultados de las determinaciones practicadas.

Tabla 8.6 Cuantificación de biomasa en tres diferentes películas

Película	Espesor (micras)	Nitrógeno Kjeldahl (mg N/cm ²)	Sólidos suspendidos totales (mg/cm ²)
A	138	0.12	1.37
B	360	0.12	1.85
C	460	0.13	1.94

En la tabla 8.6 se observa que el contenido de SST aumenta al aumentar el espesor, aunque no de forma lineal. El hecho de que el nitrógeno orgánico tenga prácticamente el mismo valor en las tres películas analizadas indica que, independientemente del contenido de material carbonoso, la cantidad de proteína presente es constante. Es posible que al incrementarse el espesor de la biopelícula solo aumente el contenido de sustancias de reserva, tales como los polímeros intra y extracelulares sin que crezca el número de células (*Schlegel*, 1985). Las características antes mencionadas dependerán de las condiciones bajo las cuales se opere el biodisco donde se genera la biopelícula. Es de suponerse que el espesor de la biopelícula aumenta al crecer la carga orgánica.

8.3 Cinética de eliminación de material nitrogenado

Las figs 8.14 y 8.15 muestran las curvas de consumo de oxígeno para la oxidación de cloruro de amonio y de aguas tratadas de la tercera etapa del sistema.

El valor de respiración endógena obtenido durante la degradación de material nitrogenado fue de 20 a 35 por ciento de la respiración total, el cual es menor que el obtenido para la eliminación de material carbonoso (40-70 por ciento de la respiración total). Esto es explicable ya que las biopelículas utilizadas provienen de la tercera etapa del biodisco. Estas biopelículas son más delgadas que las de la primera etapa y los microorganismos presentes, aunque en su mayoría son heterótrofos, están acostumbrados a alimentarse de las sustancias que no fueron degradadas en las primeras etapas o de los productos excretados por los microorganismos en etapas anteriores. Esto hace que estos tengan una capacidad menor para almacenar sustancias alimenticias, lo cual produce que los valores de respiración endógena sean menores que los de etapas previas.

Es necesario aclarar que las diferentes concentraciones de amoníaco en el caso de la utilización de aguas tratadas de la tercera etapa del biodisco se lograron por dilución con agua destilada. Al diluir el agua tratada también se diluyó el contenido de material orgánico que llega en pequeñas cantidades a la tercera etapa del biodisco.

Las figuras 8.16 y 8.17 muestran las curvas de la respiración de sustrato utilizando cloruro de amonio y aguas tratadas de la tercera etapa del sistema, respectivamente. El resultado es la resta de la respiración endógena de la respiración combinada. Se observa que las curvas alcanzan un valor constante cuando termina la transformación del material nitrogenado por nitrificación. Las pendientes iniciales cambian con la concentración inicial de sustrato. Se considera que, al no haber una respiración endógena posterior a la terminación del sustrato, los organismos no almacenan sustancias durante la oxidación de amonio que después pueden utilizar como fuente endógena de alimento.

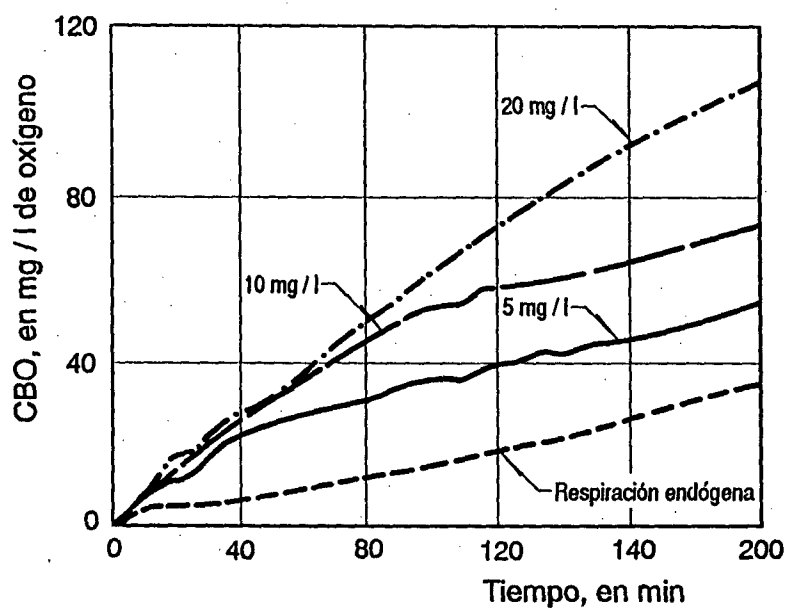


Fig 8.14 Consumo bioquímico de oxígeno para cloruro de amonio

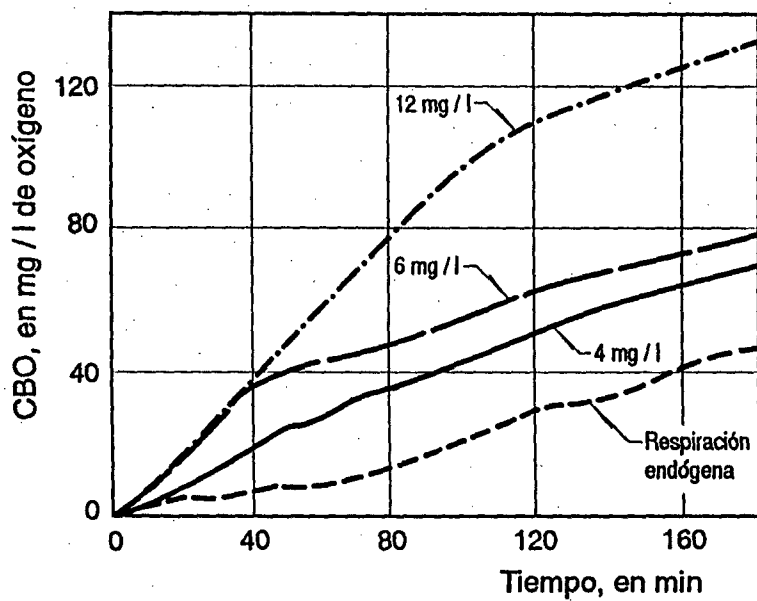


Fig 8.15 Consumo bioquímico de oxígeno para aguas tratadas de la tercera etapa del sistema

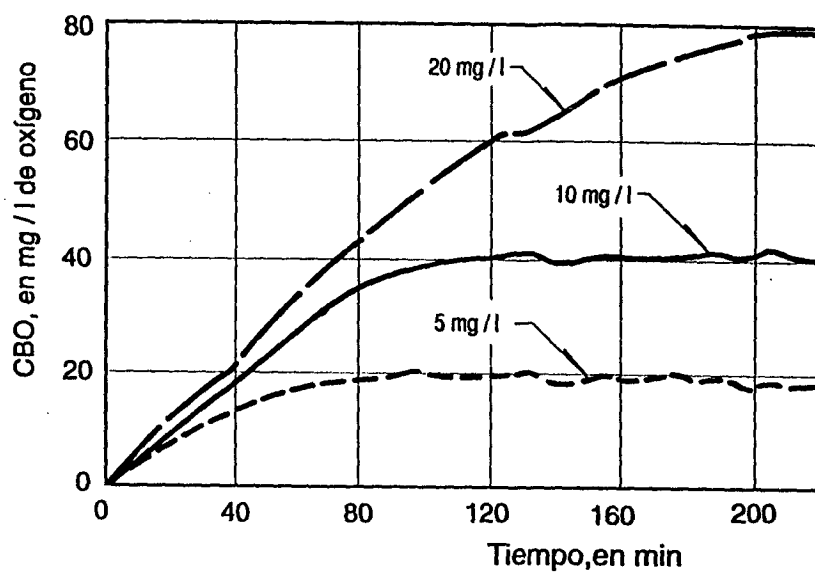


Fig 8.16 Consumo bioquímico de oxígeno para cloruro de amonio

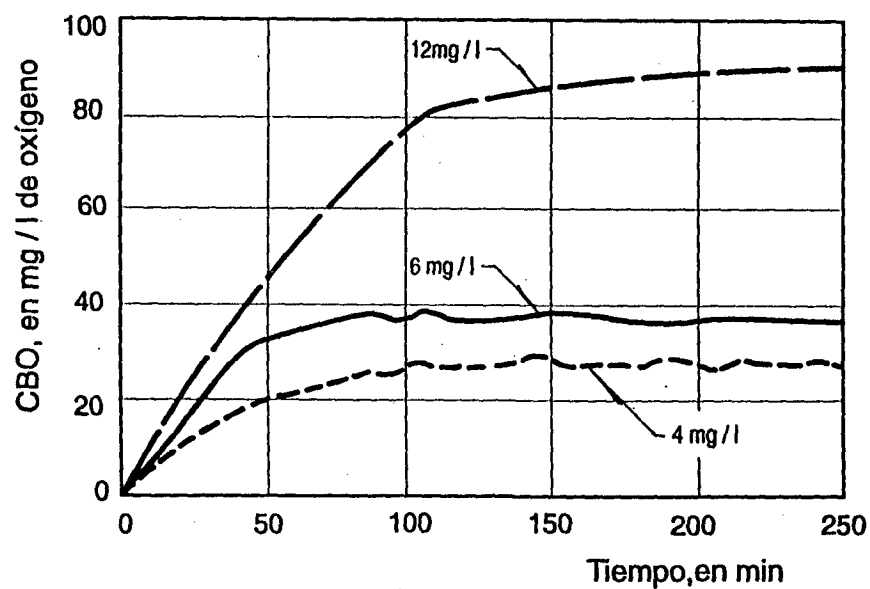


Fig 8.17 Consumo bioquímico de oxígeno para aguas tratadas de la tercera etapa del sistema

Los resultados obtenidos a partir de las figs 8.16 y 8.17 se resumen en la tabla 8.7. En dicha tabla se observa que los valores de CBO_f y de rapidez de reacción inicial son mayores para aguas tratadas de la tercera etapa del sistema que para cloruro de amonio. Esto se debe a que las aguas residuales tienen material orgánico que, al ser degradado, contribuye con el consumo de oxígeno y su valor se suma al consumo por oxidación de amoníaco.

Tabla 8.7 Valores de consumo final de oxígeno y de rapidez de degradación del sustrato

Sustrato	Concentración inicial (mg / l)	CBO_f (mg de O_2 / l)	Rapidez inicial de consumo (mg O_2 / l min)	Coefficiente de correlación
Cloruro de amonio	5	18.91	0.32	0.973
	10	40.11	0.45	0.994
	20	73.85	0.54	0.998
Aguas tratadas	4	22.51	0.50	0.999
	6	37.66	0.73	0.978
	12	88.45	0.91	0.994

8.3.1 Obtención del consumo específico de oxígeno para material nitrogenado

Partiendo de la tabla 8.7, las figs 8.18 y 8.19 se construyeron para determinar el consumo específico de oxígeno. Los resultados se presentan en la tabla 8.8.

Tabla 8.8 Valores de consumo específico de oxígeno

Sustrato	CEO teórico (mg O_2 / mg S)	CEO experimental (mg O_2 / mg S)	Ordenada al origen (mg O_2 / l)	Coefficiente de correlación
Cloruro de amonio	4.57	3.62	2.04	0.996
Aguas tratadas	4.57	8.29	- 11.28	0.999

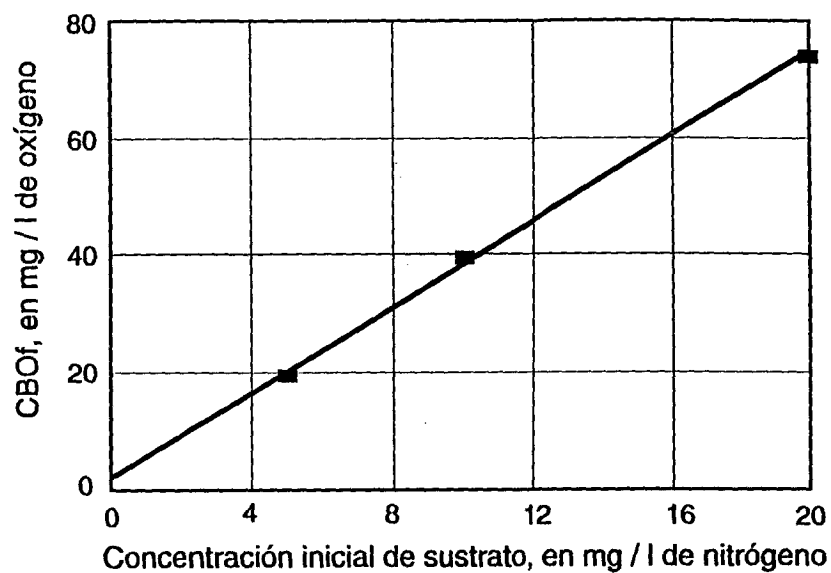


Fig 8.18 Obtención del consumo específico de oxígeno para cloruro de amonio

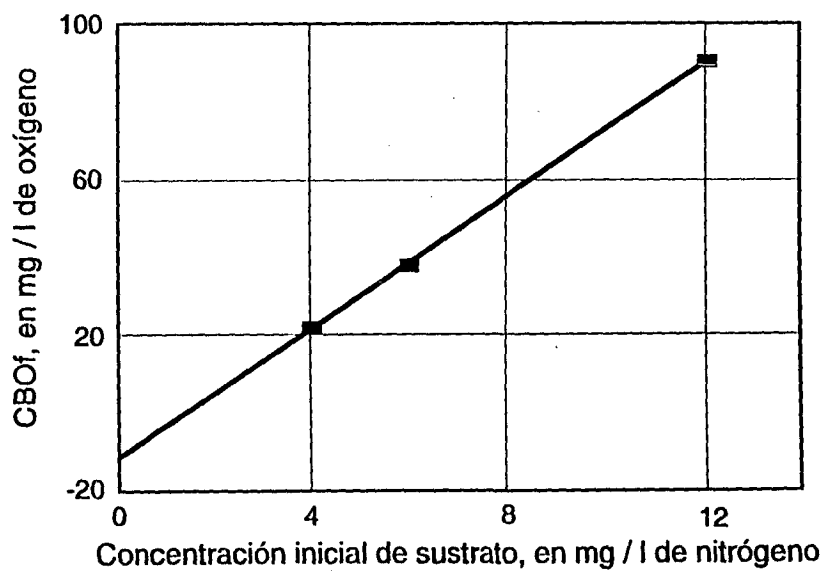


Fig 8.19 Obtención del consumo específico de oxígeno para aguas tratadas de la tercera etapa del sistema

En la tabla 8.8 se nota que el valor de CEO experimental para cloruro de amonio es muy similar al teórico. Sin embargo, cuando se utilizaron aguas tratadas de la tercera etapa del sistema, el valor experimental supera al teórico en aproximadamente 50 por ciento. Esto se debe a la presencia de organismos heterótrofos, los cuales consumen oxígeno para degradar el material carbonoso no asimilado en las primeras etapas del sistema.

El valor de la ordenada al origen utilizando cloruro de amonio fue de 2.04 mg O₂/l y se atribuye al consumo de oxígeno requerido para las síntesis de las enzimas involucradas en el proceso de degradación. Para aguas tratadas de la tercera etapa del biodisco el valor obtenido fue de -11.28 mg O₂/l, el cual puede deberse, como en el caso de la degradación de material carbonoso, a subestimación de los valores de consumo de oxígeno debidos a procesos metabólicos con fines de mantenimiento celular o a errores experimentales.

8.3.2 Obtención de las constantes de *Michaelis* y *Menten* para la degradación de material nitrogenado

Las figs 8.20 y 8.21 muestran los resultados de la aplicación del método propuesto por *Lineweaver* y *Burk*, utilizando cloruro de amonio y aguas tratadas de la tercera etapa del biodisco, respectivamente.

A partir de las figs 8.20 y 8.21 se obtienen los valores de las constantes, los cuales se muestran en la tabla 8.9.

Tabla 8.9 Valores de las constantes de *Michaelis* y *Menten*

Sustrato	V _{máx} (mg O ₂ /l min)	k _s (mg S/l)	Coefficiente de correlación
Cloruro de amonio	0.71	5.91	0.999
Aguas tratadas de la tercera etapa	1.70	9.10	0.950

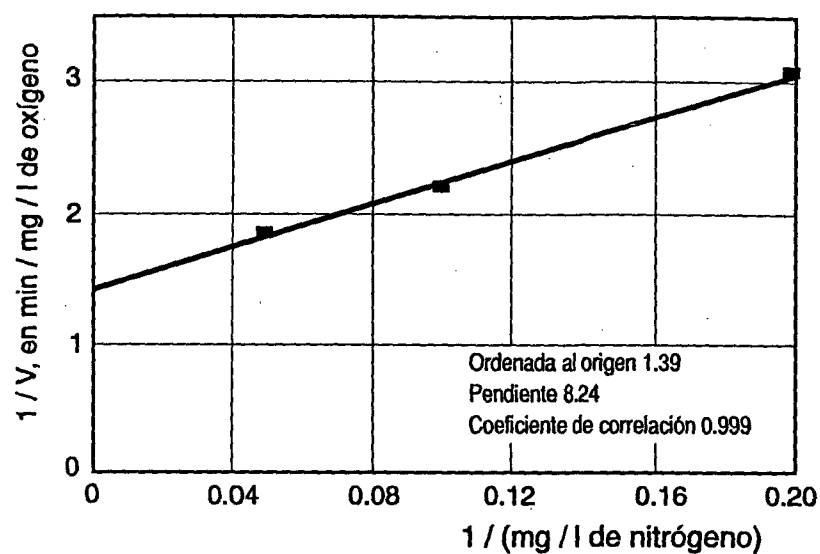


Fig 8.20 Linearización de Lineweaver y Burk utilizando cloruro de amonio

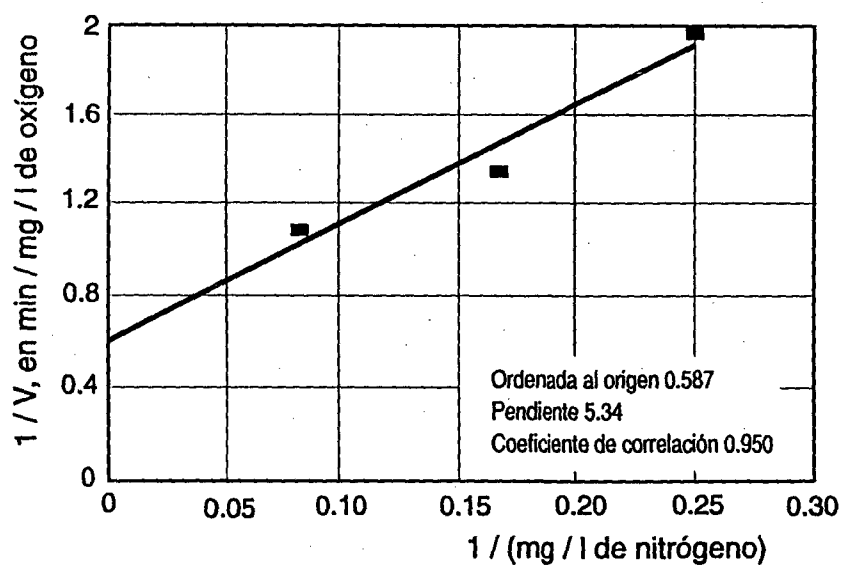


Fig 8.21 Linearización de Lineweaver y Burk utilizando aguas tratadas de la tercera etapa del sistema

De acuerdo con los resultados de la tabla 8.9, el sustrato nitrogenado más afín al sistema enzimático de los microorganismos es el cloruro de amonio (menor valor de k_s). En el caso de las aguas tratadas de la tercera etapa del sistema se obtuvo un valor mayor para k_s . Sin embargo, este sustrato se degrada más rápidamente que el cloruro de amonio como consecuencia de la aclimatación de los microorganismos en el ambiente en el cual se desarrollan.

Finalmente, es necesario aclarar que los valores de $V_{m\acute{a}x}$ y de k_s para el agua tratada de la tercera etapa del sistema de biodisco, se ven influidos por dos tipos de sustancias que actúan en forma simultánea sobre el consumo de oxígeno de una u otra sustancia. Como los grupos de bacterias que actúan sobre los dos sustratos tienen metabolismos diferentes y no competitivos entre sí, es posible considerar entonces que el consumo de oxígeno total es la suma de la respiración endógena, más la respiración de amoníaco y la respiración de material carbonoso.

9. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones de este estudio son:

1. Se comprobó que el respirómetro diseñado para realizar este trabajo sirve de forma confiable, para la determinación de la cinética de eliminación de sustratos con películas biológicas.
2. El respirómetro puede trabajar con biopelículas generadas en diferentes partes del bio-disco para estudiar la cinética de diferentes poblaciones microbianas.
3. El modelo propuesto por *Michaelis y Menten* es adecuado para describir el comportamiento cinético involucrado en la degradación de material carbonoso y nitrogenado en películas biológicas.
4. La cinética de eliminación de material y nitrogenado que se puede estudiar con el respirómetro se influye por la actividad de las bacterias heterótrofas. Dichas influencias pueden ser eliminadas al restar la respiración endógena cuando se utiliza una solución libre de material carbonoso.
5. Los valores para consumo específico de oxígeno y para las constantes de *Michaelis y Menten* son afectados por un gran número de procesos bioquímicos, fisiológicos y ecológicos. De especial interés es la influencia de la respiración endógena después de la degradación del material orgánico, ya que dificulta la selección de los puntos donde termina la respiración de sustrato.

6. El valor de consumo específico de oxígeno (CEO) durante la degradación de material carbonoso (acetato de sodio y glucosa) es menor que su valor estequiométrico debido a los procesos de almacenamiento celular.
7. El valor experimental de CEO para material nitrogenado utilizando cloruro de amonio es muy similar al teórico. Sin embargo, al utilizar aguas tratadas de la tercera etapa del sistema de biodisco el valor de CEO se incrementa aproximadamente 50 por ciento sobre el valor teórico. Esto se debe al oxígeno consumido por los organismos heterótrofos presentes en las películas nitrificantes, los cuales consumen oxígeno para degradar el material carbonoso contenido en la muestra de agua al mismo tiempo que las bacterias autótrofas consumen oxígeno para la oxidación del amoníaco.
8. El agua residual cruda presenta una rapidez máxima de degradación superior a la de la glucosa o acetato de sodio. Los valores de k_s son menores para acetato de sodio después para glucosa y finalmente para aguas residuales crudas.
9. Los valores de $V_{m\acute{a}x}$ y k_s de la degradación de los compuestos contenidos en el agua de la tercera etapa del biodisco son mayores que cuando se degrada exclusivamente cloruro de amonio.
10. Los contaminantes contenidos en las aguas residuales cruda y de la tercera etapa del sistema se degradan más rápidamente (valores mayores de $V_{m\acute{a}x}$) que los sustratos puros. Esto se debe a que las biopelículas utilizadas ya estaban aclimatadas a estos sustratos.
11. La biopelícula de la tercera etapa del biodisco, aunque aparenta ser extremadamente delgada y casi imperceptible, es tan activa como la de las etapas anteriores para eliminar carbono, además de eliminar amoníaco. Este hecho indica que la actividad de la biopelícula está en función del área superficial expuesta al intercambio de nutrientes y no de la cantidad de microorganismos presentes.

BIBLIOGRAFÍA

APHA, AWWA y WPCF (1985), Standard methods for the examination of waste and wastewater, American Public Health Association, American Water Works Association y Water Pollution Control Federation, 16a ed, Washington, EUA

Antonie, R (1975), Fixed biological surfaces, wastewater treatment, CRC Press Inc, Ohio

Autotrol Corporation (1978), Design manual, wastewater treatment systems, Autotrol Corporation, Milwaukee, EUA

Comisión del Plan Nacional Hidráulico (1981), "Disponibilidad de agua y suelo", Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos, Anexo 2 del Plan Nacional Hidráulico, México, DF

Conn, E y Stumpf, K (1988), Bioquímica fundamental, Limusa, 3a ed, México, DF

Departamento del Distrito Federal (1991), "Programa del uso eficiente del agua", Departamento del Distrito Federal, Secretaría General de Obras y Dirección General de Construcción y Operación Hidráulica, México, DF

Gaudy, A y Gaudy, E (1981), *Microbiology for environmental scientists and engineers*, McGraw Hill series in Water resources and environmental engineering, EUA

Göbel-Meurer, H (1979), *Der Einfluss von pH-wert und Temperatur auf die kinetik mikrobieller Systeme am Beispiel von *Sporosarcina ureae**, Institut für Ingenieurbiologie und Biotechnologie des Abwassers, Universidad de Karlsruhe, Alemania

González, S y Díaz, L (1987), "Determinación de la cinética en películas biológicas para tratamiento de aguas de desecho", tesis de maestría, Facultad de Ciencias, UNAM, Méxi-co, DF

González, S y Duque, J (1991), "Aerobic submerged biofilm reactors for wastewater treatment", *Water Research*, vol 26, Nº 6, Gran Bretaña, pp 825-833

González, S y Ellas, G (1989), "Diseño de biodiscos", Series del Instituto de Ingeniería UNAM, Nº 520, México, DF

Harremões, P (1978), Biofilm kinetics, En: *Water Pollution Microbiology*, vol 2, Mitchell, J (ed), John Wiley and Sons, EUA

Hawkes, H (1963), *The ecology of wastewater treatment*, Pergamon Press, EUA

Hawkes, H (1983), "The applied significance of ecological studies of aerobic process", En *Ecological aspects of used-water treatment*, vol 3, Curds, C y Hawkes, H (eds), Academic Press, EUA

Lehninger, A (1976), *Bioquímica*, Omega, Barcelona, España

Luna, V, Aladro, M y Durán, C (1990), *Microrganismos indicadores del tratamiento biológico de aguas residuales: Efecto de la temperatura sobre la diversidad*

abundancia de protozoarios ciliados, Programa de Ingeniería Química Ambiental y Química Ambiental, Facultad de Química, UNAM, México, DF

Painter, H (1983), "Metabolism and physiology of aerobic bacteria", En: *Ecological aspects of used water treatment*, vol 2, Curds, C y Hawkes, H (eds), Academic Press, EUA

Peters, H (1979), *Einfluss der Temperatur auf die BSB-Kinetik gezeigt am Beispiel Escherichia coli*, Institut für Ingenieurbiologie und Biotechnologie des Abwassers, Universidad de Karlsruhe, Alemania

Quintero, R (1981), *Ingeniería bioquímica*, Alhambra Mexicana, México, DF

Ramírez, C (1988), *Nitrificación y destrucción de la alcalinidad en una unidad de biodiscos estructuralmente modificada y su efecto sobre el crecimiento de algas en el efluente almacenado*, tesis de maestría en Ingeniería Ambiental, División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ingeniería, UNAM, México, DF

Schlegel, H (1985), *Allgemeine Mikrobiologie*, Editorial Thieme, Alemania

Segel, I (1975), *Enzyme kinetics*, John Wiley and Sons, EUA

Shieh, W y Mulcahy, L (1986), "Experimental determination of intrinsic kinetic coefficients for biological wastewater treatment systems", *Water Science Technology* vol 18, Gran Bretaña, pp 1-10

Winkler, M (1986), *Tratamiento biológico de aguas de desecho*, Limusa, México, D F