

00361

5

20g

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE CIENCIAS

DETERMINACION DE LA CINETICA
DE PELICULAS BIOLÓGICAS

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS
(BIOLOGIA)

PRESENTA
LEONOR DIAZ MORA

1988

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

	Pág.
1. INTRODUCCION	1
2. CINETICA ENZIMATICA EN PELICULAS BIOLOGICAS	5
2.1 Películas biológicas en sistemas de tratamiento de aguas de desecho doméstico	6
2.2 Formación de la biopelícula	8
2.3 Algunos aspectos de la microbiología de películas en sistemas de biodisco	10
2.4 Difusión de nutrientes en películas aerobias	13
2.5 Metabolismo aerobio	15
2.6 Cinética enzimática en películas aerobias	16
3. RESPIROMETRIA	22
3.1 Relación entre consumo de sustrato y consumo de oxígeno	23
3.2 Respirómetro de Warburg	28
3.3 Sapro-mat	32
4. DESARROLLO DEL METODO EXPERIMENTAL	35
4.1 Diseño del recipiente de reacción y del sistema de tracción	35
4.2 Generación y caracterización de la película	

	Pág.
biológica	39
4.3 Utilización del SAPROMAT	40
4.4 Utilización del respirómetro Warburg	42
4.5 Determinaciones cinéticas	42
4.6 Temperatura y pH	43
4.7 Sustratos	43
5. RESULTADOS Y DISCUSION	44
5.1 Experimentación con el SAPROMAT	44
5.2 Experimentación con el respirómetro WARBURG	50
5.2.1 Degradación de acetato de sodio	50
5.2.2 Degradación de glucosa	54
6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	59
7. APENDICE	66
BIBLIOGRAFIA	69

1. INTRODUCCION

En los últimos años en México, se tienen dificultades para obtener agua en cantidad y calidad adecuadas para las diversas actividades del hombre; por ello, se ha pensado seriamente en la reutilización del agua de desecho, siendo un requisito indispensable para ello, el tratamiento previo (Norouzian, 1984; Aguirre, 1986). El tratamiento biológico de aguas de desecho, persigue eliminar la materia biodegradable de las aguas residuales y consiste en acelerar el desarrollo de los microorganismos encargados de efectuar los procesos naturales de autodepuración de los cuerpos de agua (Montejano, *et al*, 1968; Kornegay, 1968; Norouzian, 1984).

Los procesos biológicos de película para el tratamiento de aguas de desecho han tenido gran éxito en los últimos años, desde que la utilización de materiales plásticos se ha vuelto

práctica común. Estos procesos han demostrado sencillez y seguridad en su operación con respecto a otros sistemas convencionales una revisión cronológica de los desarrollos progresivos de las películas fijas, nos da una relación histórica significativa y nos proyecta de alguna manera el futuro de la aplicación de las mismas (Benefield, 1980; Brayers, 1982; Grady, 1982; Peters y Alleman, 1982); el presente estudio se enfoca a en procesos biológicos de película fija rotatoria.

La utilización de aguas de desecho en riego de áreas verdes y bosques, en irrigación de ciertos campos agrícolas y en algunos procesos industriales, presenta problemas generados en el desconocimiento de algunos de los procesos básicos involucrados en el tratamiento biológico (Metcalf & Eddy, 1977).

La cantidad de información generada por la investigación desde 1970 es superior a la generada durante el resto del siglo 20, exclusivamente en películas biológicas. A pesar de esto, el conocimiento que se tiene sobre los mecanismos involucrados en la utilización de nutrientes (eliminación de contaminantes) en películas biológicas aún presenta muchas interrogantes, originadas en muchos casos por la carencia de un método eficiente para la determinación de parámetros cinéticos. El conocimiento de la cinética de los procesos biológicos es esencial para la comprensión de los mecanismos de la degradación de sustratos y de los factores que los afectan. Asimismo

mo, permite al investigador desarrollar procedimientos de diseño adecuados al caso por tratar (Morris, 1976; Grady, 1982).

El objeto de estudio de la presente investigación es la determinación de la cinética de películas biológicas. En la presente tesis se abordan dos aspectos de tal determinación: 1) se desarrolla y concreta un método para hacer determinaciones de la cinética de la degradación de sustratos en películas biológicas aerobias; y 2) se determinará en primera instancia dicha cinética.

Dentro de los alcances del trabajo se consideran: 1) la construcción del aparato que permita conocer los pasos de la degradación de sustratos a través de la medición del oxígeno consumido durante la degradación. Con objeto de que las películas utilizadas durante la experimentación tengan las mismas características que las películas utilizadas en plantas para tratamiento de aguas de desecho domésticas, serán generadas en el biodisco que se encuentra en la Planta para Tratamiento de Aguas de Desecho de Ciudad Universitaria; y 2) la determinación, en una primera aproximación, de la cinética de la degradación de sustratos -acetato de sodio y glucosa- por películas biológicas fijas rotatorias.

Se sugiere un diseño experimental empleando el modelo aquí desarrollado para determinar en forma más precisa y confiable

la cinética de la degradación de sustratos utilizando acetato de sodio y aguas de desecho domésticas, de la Planta de Tratamiento de Aguas de Desecho de Ciudad Universtiaría.

2. CINETICA ENZIMATICA EN PELICULAS BIOLOGICAS

Las bacterias abarcan una cantidad enorme de actividades metabólicas y se ajustan rápidamente a los cambios del medio. La gran diversidad metabólica presentada por los microorganismos asegura que la mayoría de las sustancias orgánicas naturales, introducidas en un medio acuático, sean utilizadas y transformadas por los microorganismos. No ocurre lo mismo con las sustancias recalcitrantes o de lenta degradación, como son los detergentes, herbicidas, pesticidas y otros productos industriales sintéticos.

Algunas bacterias presentes en ecosistemas acuáticos naturales se adhieren a superficies sólidas como los cascos de los barcos, muelles, embarcaderos, rocas, y plantas y animales acuáticos, formando sobre ellos una película biológica cuando hay cantidades adecuadas de nutrientes orgánicos, sales

minerales y oxígeno disponible. Estas comunidades se caracterizan por vivir dentro de una matriz gelatinosa, producida por los mismos microorganismos, algunos de los cuales pueden moverse libremente dentro de ella. El crecimiento de la película continúa hasta que la superficie sólida está totalmente cubierta (Hoehn y Ray, 1973; Odum, 1982).

2.1 Películas biológicas en sistemas de tratamiento de aguas de desecho

Las películas biológicas utilizadas en sistemas de tratamiento de aguas de desecho son similares a las que se desarrollan sobre piedras que se encuentran en el fondo de algún río o arroyo que recibe una descarga de aguas de desecho. Los procesos biológicos son parecidos en los dos casos.

La película biológica efectúa la degradación del material orgánico soluble y coloidal que se encuentra como contaminante de las aguas de desecho, además de poder llevar a cabo los procesos de oxidación de amoníaco (nitrificación) cuando existe un exceso de oxígeno disuelto en el agua.

Como ejemplo de películas anaerobias, se pueden mencionar los reactores empacados anaerobios y los de cama fluidizada.

Existen sistemas de tratamiento de aguas de desecho con pelí-

.. cula biológica aerobia o con película anaerobia. Los procesos biológicos que se realizan en cada uno de ellos son totalmente diferentes. Ejemplo de películas aerobias son los que se desarrollan en filtros percoladores biológicos o en contactores biológicos rotatorios.

Los filtros anaerobios empacados consisten en un cilindro lleno de algún material inerte sobre cuya superficie se desarrolla la película biológica. De forma diferente al filtro percolador biológico, la película se encuentra sumergida en el agua de desecho, la cual puede circular de forma ascendente o descendente.

Los reactores de cama fluidizada son cilindros en los cuales el agua de desecho siempre fluye de forma ascendente con objeto de mantener en suspensión al material inerte que sirve de soporte a la película. Es otro ejemplo de sistemas anaerobios.

Los filtros percoladores biológicos tienen como soporte de la película algún material inerte sobre el cual se rocía el agua de desecho, la cual escurre sobre la película biológica, entrando en contacto con ella. Por el volumen libre entre el material de soporte circula aire para proveer de oxígeno a los microorganismos. Es un sistema aerobio muy difundido.

Los contactores biológicos rotatorios o biodiscos constan de una serie de discos de material inerte, montados sobre una flecha común y sobre un tanque de tal forma que los discos se encuentran parcialmente sumergidos en las aguas de desecho. Al girar el tren de discos, la película biológica que crece sobre los discos entra, de forma alternada, en contacto con el aire y con el agua de desecho.

Una gran parte de los estudios realizados con biopelículas en sistemas de tratamiento de aguas de desecho se ha enfocado principalmente a la degradación de la materia orgánica y a su relación con el crecimiento y formación de la película (Hoen y Ray, 1973; Bryers, 1982; Grady, 1982).

2.2 Formación de la biopelícula

La formación de una biopelícula sobre una superficie expuesta continuamente a un líquido que contiene nutrientes es el resultado neto de procesos físicos, químicos y biológicos, tales como:

- Transporte y adsorción de moléculas orgánicas en la superficie.

- . Transporte de microorganismos hasta la superficie.
- . Adhesión de los microorganismos a la superficie.
- . Transformaciones microbianas producto de la actividad metabólica: crecimiento y producción de polímeros ex-tracelulares, los cuales produce la biopelícula.
- . Separación parcial de la película causada por la fuerza cortante del agua sobre la película.

Los tres primeros puntos comprenden la etapa de inducción ca racterizada por la formación de una capa primaria de microorganismos sobre la superficie sólida inerte. La segunda etapa es la de acumulación, la cual se caracteriza por dos fases: la primera, de acumulación por crecimiento hasta alcanzar la segunda fase, de acumulación constante, en la cual el espesor de la película es constante debido al equilibrio que se establece entre desprendimiento y crecimiento (Truelar y Characlis, 1982).

De lo anterior se desprende que el espesor de la película depende de la rapidez de crecimiento de los microorganismos y de la acción mecánica (fricción) que existe entre la película y el agua. Los procesos anteriormente descritos se encuentran representados en la Fig 2.1. La acción de organismos de

predadores, o de organismos que utilicen la biopelícula como fuente de alimento, puede afectar tanto el desarrollo de una película, como la forma de crecimiento de los microorganismos y el espesor de la misma.

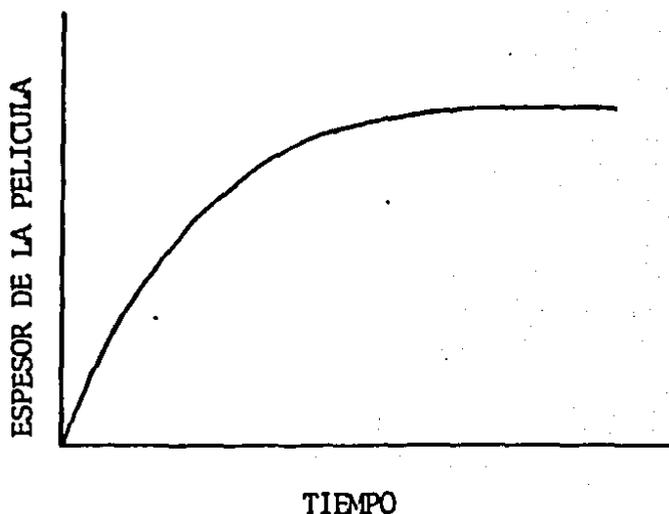


FIGURA 2.1. Desarrollo de la biopelícula (Hoehn y Ray, 1973).

2.3 Algunos aspectos de la microbiología de películas biológicas en sistemas de biodisco

Observaciones al microscopio de películas formadas en sistemas de biodisco, revelan que están constituidas por estratos de organismos morfológicamente diferentes, entre ellos, 90 a 99% son bacterias. La capa más superficial de la película esta compuesta de bacterias filamentosas entretrejidas, y la capa basal presenta bacilos y riquetsias (Alleman, 1982; No-

rouzian y Deloya, 1984; Rittman y McCarty, 1980a).

Norouzian (1984) y Norouzian y Deloya (1984) en estudios acerca de la microbiología de biodiscos mencionan la presencia de bacterias organotróficas, nitrificantes y ureolíticas, representada, cada una de ellas, por varias especies.

Las bacterias organotróficas requieren componentes orgánicos como fuente de carbón y energía; son un grupo muy importante en términos de tratamiento de agua de desecho doméstico, dado que son los responsables de la degradación de la materia orgánica; entre ellas se encuentran las bacterias filamentosas *Sphaerotilus natans*, *Nocardia* spp., *Thiothrix* spp., *Nostocoida limicola*, *Haliscomenobacter hydrossis*, y *Microthrix parvicella*; las bacterias nitrificantes son responsables del proceso de la nitrificación, proceso muy importante en el tratamiento de agua. La oxidación de amonía a nitrito y finalmente, a nitrato, involucra bacterias de los géneros *Nitrococcus*, *Nitrosomas* y *Nitrobacter*; y en la tercera categoría importante de bacterias, las ureolíticas, encontramos al género *Proteus* como el más conocido e importante (Norouzian, 1984).

Los microorganismos que llevan a cabo los procesos de degradación de materia orgánica son, principalmente, las bacterias; no obstante, los procesos de la película se ven afectados también por hongos, protozoarios y algunos metazoarios como nemá-

todos, rotíferos, crustáceos y gusanos planos (Moreno, 1985 y Norouzian, 1984).

Los hongos degradan materia orgánica y, en las últimas etapas del biodisco son fuente de alimento para los protozoarios, rotíferos y gusanos planos (Moreno, 1985 y Norouzian, 1984).

Los protozoarios juegan un papel importante en la remoción de materia orgánica sólida. Muchos ciliados y amibas, al igual que algunos flagelados, engloban partículas de detritus (Moreno, 1985 y Norouzian, 1984). Este importante grupo es indicador del nivel de contaminación del agua; así, los desechos pobremente degradados presentan mayor abundancia de ellos y, menor, cuando los desechos están muy degradados. La presencia de ciliados indica un ambiente estable (Norouzian, 1984).

Un gran número de especies de protozoarios se alimentan de bacterias, controlando así el grosor de la película (Norouzian, 1984).

Los nemátodos, los rotíferos y los crustáceos juegan un papel importante en los procesos de la película fija. Algunos de ellos se alimentan de bacterias controlando, consecuentemente el grosor de la película (Moreno, 1985).

Los metazoarios agregados en la biopelícula son todos aero-

bios estrictos y, por lo tanto, se establecen en la superficie de la misma. Los rotíferos son los metazoarios dominantes y consumen numerosos cúmulos de bacterias (Moreno, 1985).

Al remover constantemente la película a causa de su movimiento, los gusanos planos, permiten la difusión de oxígeno a las capas más profundas, favoreciendo consecuentemente la descomposición de materia orgánica por vía aerobia (Moreno, 1985).

La microbiología de los biodiscos está solo parcialmente estudiada, se sabe sin embargo, que los microorganismos de película fija son similares a aquellos de lodos activados; la diferencia estriba en la sucesión de comunidades que se genera en los sistemas de película fija (biodisco, filtros percoladores) a diferencia de las poblaciones uniformemente mixtas de los lodos activados (Moreno, 1985).

2.4 Difusión de nutrientes en películas aerobias

En los casos de los contactores biológicos rotatorios, la película biológica se encuentra en contacto, de forma alternada, tanto con el agua de desecho contenida en el tanque del sistema, como con el oxígeno del aire. Esto origina que la película siempre esté cubierta de una capa de agua a través de la cual se difunden los nutrientes: material orgánico e inorgánico contenido en las aguas de desecho y oxígeno molecul

bios estrictos y, por lo tanto, se establecen en la superficie de la misma. Los rotíferos son los metazoarios dominantes y consumen numerosos cúmulos de bacterias (Moreno, 1985).

Al remover constantemente la película a causa de su movimiento, los gusanos planos, permiten la difusión de oxígeno a las capas más profundas, favoreciendo consecuentemente la descomposición de materia orgánica por vía aerobia (Moreno, 1985).

La microbiología de los biodiscos está solo parcialmente estudiada, se sabe sin embargo, que los microorganismos de película fija son similares a aquellos de lodos activados; la diferencia estriba en la sucesión de comunidades que se genera en los sistemas de película fija (biodisco, filtros percoladores) a diferencia de las poblaciones uniformemente mixtas de los lodos activados (Moreno, 1985).

2.4 Difusión de nutrientes en películas aerobias

En los casos de los contactores biológicos rotatorios, la película biológica se encuentra en contacto, de forma alternada, tanto con el agua de desecho contenida en el tanque del sistema, como con el oxígeno del aire. Esto origina que la película siempre esté cubierta de una capa de agua a través de la cual se difunden los nutrientes: material orgánico e inorgánico contenido en las aguas de desecho y oxígeno molecu

lar (ver figura 2.2).

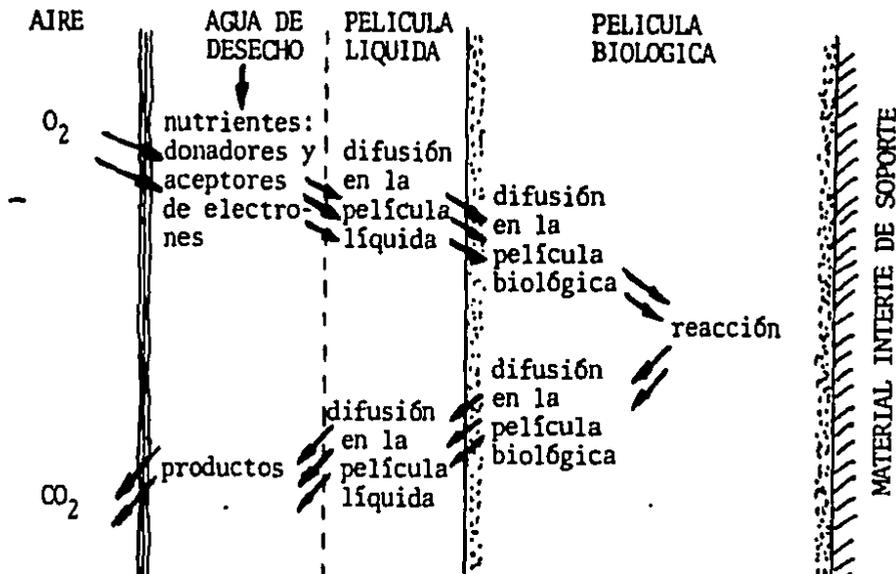


FIGURA 2.2. Diagrama de los procesos involucrados en el transporte de nutrientes y productos en la biopelícula (Harremoës, 1978).

El agua de desecho contiene los nutrientes, los cuales se difunden a través de la película líquida que se forma sobre la película biológica. De forma similar el oxígeno del aire se difunde a través de la película líquida para, junto con los nutrientes, alcanzar la película biológica en la cual se difundirán hasta las paredes de las células. Posteriormente, los nutrientes son introducidos a la célula para ser utilizados generalmente por medio de reacciones redox. La célula expulsa los productos del metabolismo que ya no le son úti-

les, los cuales se difundirán, primero a través de la película biológica, y posteriormente, a través de la película líquida para quedar en suspensión o solución o para ser arrojados al aire.

2.5 *Metabolismo aerobio*

Algunos autores describen el proceso de utilización de sustratos acompañados de la utilización de oxígeno molecular en reacciones aerobias (Gaudy et al, 1973; Williamson y McCarty, 1976a; Williamson y McCarty, 1976b; La Motta, 1976; Rittman y McCarty, 1978; Harremoës, 1978; Rittman y McCarty, 1980a; Rittman y McCarty, 1980b; Bryers, 1982).

Las reacciones metabólicas que se llevan a cabo durante la utilización aerobia de nutrientes son diversas y muy complejas. En la figura 2.3 se presentan en forma esquemática, los principales pasos del metabolismo aerobio y la importancia del oxígeno molecular dentro del proceso.

La Motta, 1976; Williamson y McCarty, 1976a; Williamson y McCarty, 1976b; Trulear y Characlis, 1982; Bryers, 1982 y Harremoës, 1978 señalan que las reacciones enzimáticas que se llevan a cabo dentro de la célula son reacciones de saturación que se comportan según la teoría de Michaelis y Menten.

Como se observa en la Fig 2.2 los pasos involucrados en el aprovechamiento de nutrientes por una película biológica afectan la reacción global de diferentes formas. La reacción global que conduce a la eliminación de nutrientes involucra la difusión tanto de donadores de electrones (material orgánico) como de aceptores de electrones (oxígeno) a través de la película líquida que se forma sobre la película biológica, difusión de los mismos hacia el interior de la película biológica, la reacción enzimática fuera y dentro de las células, la difusión de productos metabólicos hacia el exterior de la película líquida. Harremoës (1978) menciona que cualquiera de estos pasos, principalmente la difusión de nutrientes y la reacción metabólica, pueden afectar el proceso global de forma importante, por lo cual se debe considerar y analizar el efecto de cada uno de dichos pasos sobre la rapidez de la reacción global.

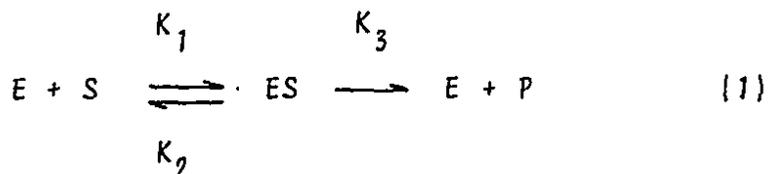
2.6 Cinética enzimática en películas aerobias

Harremoës (1978), señala que, cuando el espesor de la película es lo suficientemente pequeño para que permita la difusión de nutrientes hasta el fondo, los efectos de la difusión se vuelven despreciables y solamente la reacción enzimática controla la reacción global. Esta afirmación concuerda con los resultados de los trabajos de Hartmann et al (1971) y de Engelman (1978), los cuales fueron realizados con flóculos sus

pendidos y no con películas. El hecho de, que se haya trabajado con flóculos y no con películas no invalida la comparación, ya que en flóculos también se observan los mismos fenómenos de difusión en películas.

Considerando que el paso que controla la rapidez del proceso degradativo es la reacción enzimática, entonces el proceso puede describirse por medio de la teoría de Michaelis y Menten. Aunque durante los procesos metabólicos intervienen una gran cantidad de enzimas, solamente una de todas las reacciones enzimáticas controlará, nuevamente, los procesos enzimáticos, principio que se conoce como del mínimo esfuerzo de Liebig (Hartmann, 1971; Wilderer, 1976).

Michaelis-Menten postulan que un sustrato reacciona con una enzima para formar un complejo enzima-sustrato, el cual puede descomponerse para formar nuevamente la enzima más el sustrato o para formar la enzima más un producto. A continuación se presenta el postulado de la reacción.



La ecuación que se obtiene de la reacción anteriormente presentada es

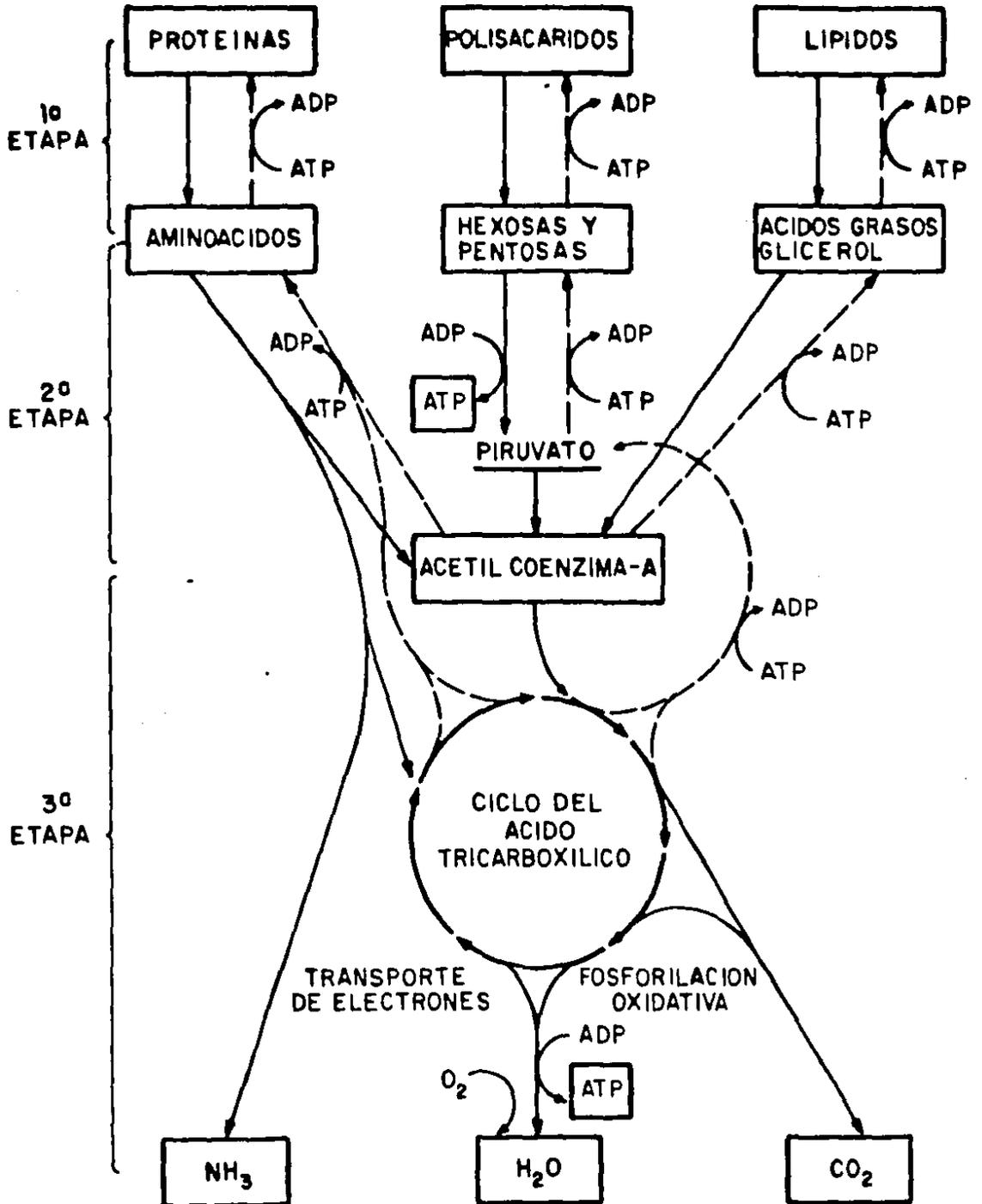


FIGURA 2.3. Principales pasos en el metabolismo aerobio

$$-\frac{dS}{dt} = v = V_{max} \frac{S}{K_m + S} \quad (2)$$

donde

- v rapidez de reacción;
- V_{max} rapidez máxima de la reacción;
- K_m constante del valor medio;
- S concentración de sustrato;
- t tiempo.

La representación gráfica de la ecuación de Michaelis-Menten es una hipérbola y, dependiendo de la concentración de sustrato, la reacción puede presentar órdenes de reacción que oscilan entre 0 y 1 (ver Fig 2.4).

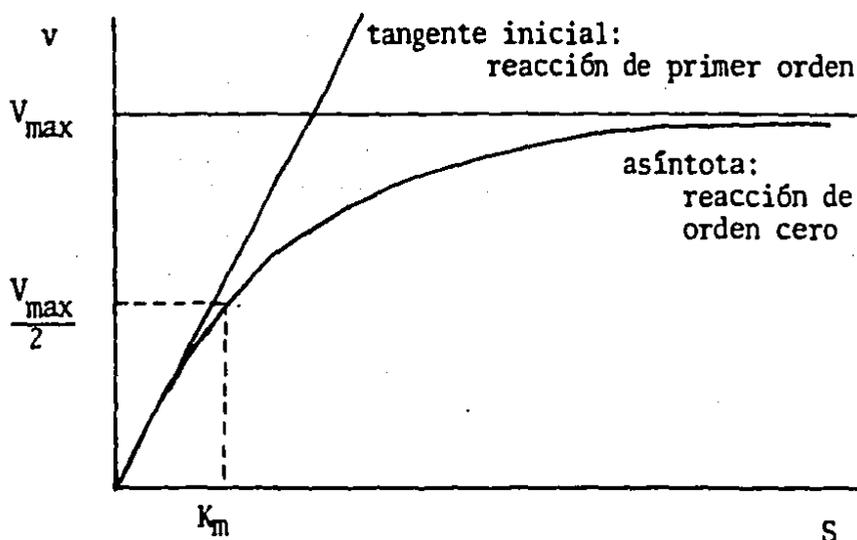


FIGURA 2.4. Hipérbola de Michaelis-Menten

Con objeto de simplificar el manejo de los datos, Lineweaver y Burk proponen utilizar una forma linearizada de la ecuación de Michaelis-Menten: (Segel, 1976, Christensen y Palmer, 1980).

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{m\acute{a}x}} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}} \quad (3)$$

Graficando $1/v$ contra $1/S$ se obtiene una recta cuya pendiente es $K_m/V_{m\acute{a}x}$ y la ordenada al origen $1/V_{m\acute{a}x}$ (ver Figura 2.5).

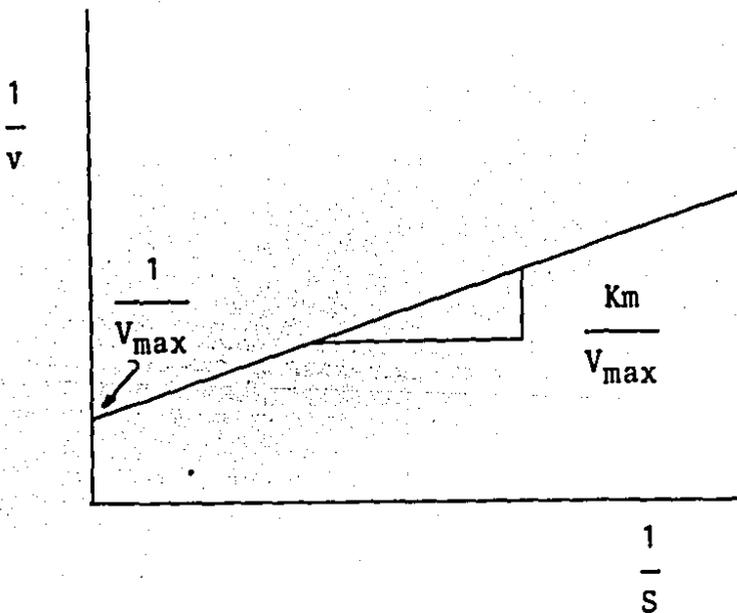


FIGURA 2.5. Gráfica de la forma linearizada de la ecuación de Michaelis-Menten por Lineweaver y Burk.

Al integrar la ecuación de Michaelis-Menten, considerando las

condiciones iniciales $S = S_0$ y $t = 0$ se obtiene la ecuación de Henri:

$$V_{m\acute{a}x} t = K_m \ln \frac{S_0}{S} + (S_0 - S) \quad (4)$$

Esta ecuación describe el comportamiento de la concentración de sustrato con respecto al tiempo. Arreglando la ecuación en su forma linealizada se obtiene la ecuación de Walker (ecuación 5) (Wilderer, 1976).

$$\frac{S_0 - S}{t} = V_{m\acute{a}x} - \frac{K_m}{t} \ln \frac{S_0}{S} \quad (5)$$

Graficando $(S_0 - S)/t$ contra $\ln(S_0/S)/t$ se obtiene una recta con pendiente igual a $-K_m$ y ordenada al origen $V_{m\acute{a}x}$ (ver Fig 2.6).

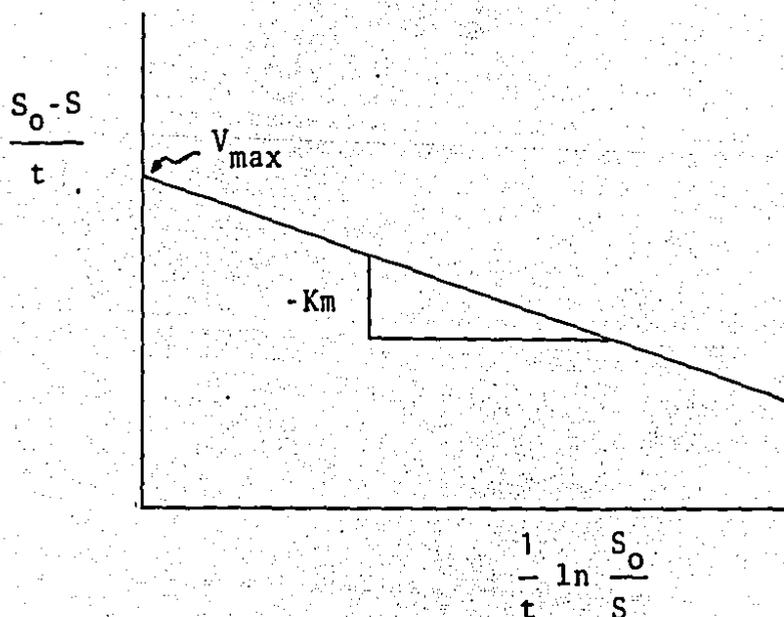


FIGURA 2.6. Representación gráfica de la ecuación de Walker

3. RESPIROMETRIA

La respirometría ha sido usada desde hace años para llevar a cabo estudios cinéticos relacionados con el consumo o la producción de gases. Se denomina respirometría porque su principal aplicación es la medición del consumo o demanda de oxígeno por microorganismos o por enzimas que utilizan el oxígeno atmosférico como oxidante.

Las primeras mediciones realizadas para determinar la cinética de absorción de oxígeno en glóbulos rojos la realizó Warburg durante la primera mitad de los años veinte en Alemania (Lehninger, 1976). Para efectuar sus mediciones, Warburg desarrolló un aparato que posteriormente se llamó "Respirómetro Warburg" y que en la actualidad se sigue utilizando.

Desde su desarrollo, el respirómetro Warburg ha sido utiliza

do en innumerables estudios de cinética enzimática. Dentro de los estudios realizados en aguas de desecho ha sido utilizado para determinar cinética de demanda de oxígeno y, consecuentemente, la cinética de consumo de sustratos por organismos aerobios. Prácticamente se ha observado que el consumo de sustrato por organismos aerobios tiene relación con el consumo de oxígeno. A continuación se detalla dicha relación y se explican dos métodos respirométricos.

3.1 Relación entre consumo de sustrato y demanda de oxígeno

Durante el metabolismo aerobio los microorganismos requieren de oxígeno para llevar a cabo sus funciones catabólicas y anabólicas. Wuhrmann (1964) informa que la demanda total de oxígeno de una población mixta como las que se encuentran en las plantas de tratamiento de aguas de desecho, durante la utilización de un sustrato, es la suma de la respiración endógena y la respiración de sustrato. Define la respiración endógena como la respiración de las células durante la oxidación de su propio material celular; por lo cual es posible medir su valor cuando las células se encuentran en un medio libre de sustratos. Aunque la definición anterior puede considerarse precisa para cultivos puros, no es posible aplicarla a cultivos de poblaciones mixtas en las cuales existan organismos depreadores, ya que, ante la ausencia de nutrientes para bacterias y hongos, los bacteriófagos tienen suficiente alimento y

consumen también oxígeno. Así, la respiración endógena de poblaciones mixtas se consiera como la respiración originada por la población cuando las bacterias y los hongos no tienen acceso a nutrientes exógenos. La respiración endógena no tiene un valor constante para una determinada población ya que cambia, dependiendo del estado fisiológico de los organismos.

Se ha observado que el valor de la respiración de una célula aumenta considerablemente en el momento en el que se le proporciona un sustrato energético (por ejemplo, glucosa o acetato de sodio). El valor de la respiración se mantiene sobre el valor de la respiración endógena hasta que el sustrato exógeno se agota y, entonces, regresa al valor de la respiración endógena. La única condición es que no exista reproducción celular durante el experimento (Wuhrmann, 1964). La respiración de sustrato es considerada, para fines prácticos, como la diferencia que existe entre la respiración de una población cuando tiene un sustrato exógeno disponible y la respiración endógena.

Durante la degradación aerobia de un sustrato en un sistema discontinuo se puede observar la disminución de la concentración del sustrato y el aumento de la suma acumulativa de la demanda de oxígeno (ver Fig 3.1).

de oxígeno efectuada (DBO_e), el cual alcanza un valor máximo final (DBO_F) cuando el sustrato ha sido metabolizado completamente. De tal forma puede observarse que el sustrato consumido ($S_0 - S_E$) es equivalente al oxígeno demandado (DBO_F) y entonces

$$\frac{DBO_n}{S - S_E} = \frac{DBO_F}{S_0 - S_E} = DEO = \text{demanda específica de oxígeno} \quad (6)$$

La DEO representa la cantidad de oxígeno requerido para oxidar por medios bioquímicos una determinada cantidad de sustrato.

De la Fig 3.1 se puede concluir que

$$DBO_e + DBO_n = DBO_F = DBO_{PL} \quad (7)$$

donde la DBO_{PL} se conoce como la demanda bioquímica de oxígeno Plateau.

Entonces la ecuación de Michaelis-Menten puede ser expresada en términos de demanda de oxígeno

$$v = \frac{d(DBO)}{dt} = v_{max} \frac{DBO}{K_m + DBO} \quad (8)$$

La forma linearizada, según Lineweaver-Burk, queda

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{DBO} + \frac{1}{V_{max}} \quad (9)$$

y la ecuación de Henri

$$t V_{max} = K_m \ln \frac{DBO_{PL}}{DBO} + (DBO_{PL} - DBO) \quad (10)$$

y en su forma lineal

$$\frac{DBO_{PL} - DBO}{t} = V_{max} - K_m \frac{1}{t} \ln \frac{DBO_{PL}}{DBO} \quad (11)$$

o, expresado de otra forma,

$$\frac{DBO_e}{t} = V_{max} - K_m \frac{1}{t} \ln \frac{DBO_F}{DBO_F - DBO_e} \quad (12)$$

Esta última forma de la ecuación linearizada de Henri es la más usual, ya que permite la utilización directa de los datos obtenidos en un respirómetro.

A continuación se describen dos aparatos utilizados para la cuantificación del oxígeno consumido por microorganismos aerobios: el respirómetro de Warburg que se basa en mediciones por diferencias de presión y el SAPROMAT que se basa en mediciones a presión casi constante.

3.2 Respirómetro de Warburg

El respirómetro de Warburg se basa en la cuantificación del oxígeno consumido o demandado por microorganismos midiendo la diferencia de presión originada por la disminución de la cantidad de oxígeno en el frasco de reacción.

La figura 3.2 muestra el diagrama de una unidad que consta de dos partes principales: manómetro y frasco de reacción. En el frasco de reacción se coloca un volumen conocido de una suspensión de microorganismos en solución amortiguadora de pH (3 ó 4 ml), en el recipiente central se coloca una pequeña tira de papel filtro empapado de una solución de hidróxido de potasio al 10% y, en el brazo, se coloca la solución con el sustrato por estudiarse. Sin cerrar a la atmósfera la llave de tres pasos, se coloca el sistema de tal forma que el frasco de reacción quede totalmente sumergido en un baño de agua a temperatura constante. Por medio de un sistema mecánico, el manómetro y el frasco de reacción se mueven para propiciar agitación dentro del frasco de reacción. Hasta después de aproximadamente 30 minutos, tiempo suficiente para que la temperatura en el frasco de reacción se estabilice, se inclina el respirómetro para que la solución de sustrato contenida en el brazo resbale hacia el fondo del frasco y entre en contacto con los microorganismos. De forma simultánea se cierra la llave, conectando el manómetro con el

frasco de reacción y aislando el sistema de la atmósfera. La agitación continúa hasta la terminación de la reacción.

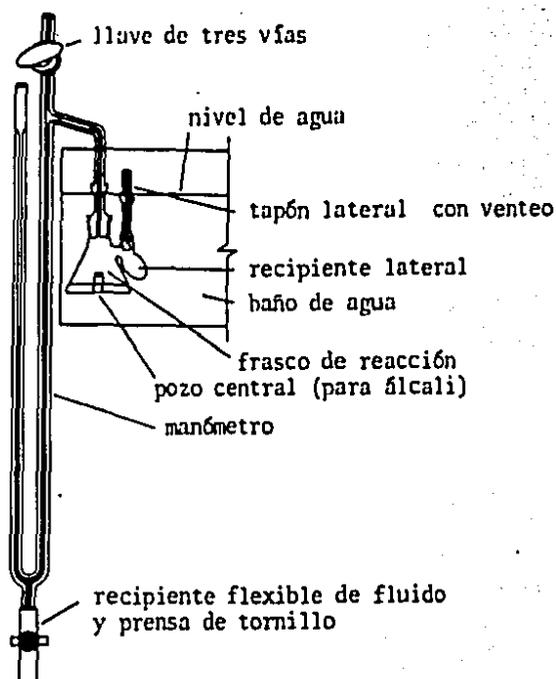


Figura 3.2. Diagrama del respirómetro Warburg

Durante la utilización del sustrato los organismos consumen oxígeno haciendo que la presión dentro del sistema disminuya y que la columna de solución dentro del lado izquierdo del manómetro suba. Por medio de la perilla de la prensa se hace bajar el nivel hasta la referencia y se toma la lectura en el lado izquierdo del manómetro.

Como el consumo de sustrato está en función del tiempo, la disminución de la presión, también. Las lecturas del manómetro se efectúan en intervalos de tiempo conocidos y así se

puede conocer la demanda de oxígeno con respecto al tiempo.

La demanda de oxígeno se calcula por medio de la ecuación 13.

$$\text{Oxígeno demandado} = K \cdot \Delta P \quad (\text{mgO}_2/\ell) \quad (13)$$

donde

K constante del frasco de reacción ($\text{mgO}_2/\ell \cdot \text{mm}$);

ΔP diferencia de presión entre lecturas (mm);

La constante del frasco de reacción se determina por medio de la siguiente relación:

$$K = 0.143 \left(V_G \cdot \frac{273}{T} + V_F \cdot \alpha_{\text{O}_2} \right) \frac{1}{V_R} \quad (14)$$

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 las soluciones de potasio y de sustrato más el volumen de la suspensión de microorganismos (ml);

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

α_{O_2} coeficiente de difusión del oxígeno en agua a la temperatura de experimentación.

Al ser tan sensible el procedimiento de mediciones es necesario hacer ajustes para eliminar los efectos de los cambios de la presión atmosférica sobre los frascos de reacción. Esto se logra utilizando un manómetro con frasco de reacción que contenga una pequeña cantidad de agua. A este manómetro se le denomina termobarómetro. Al mismo tiempo se toman lecturas en el frasco de reacción y se calcula la DBO_e por medio de la ecuación 13.

Dentro de la problemática que presenta el método de Warburg para efectuar determinaciones de la cinética de utilización de sustrato por microorganismos está el hecho de que en un frasco de reacción solamente se puede tener una sola concentración de sustrato. De la ecuación de Michaelis-Menten se observa que son necesarios valores de demanda de oxígeno para varias concentraciones para así proceder al cálculo de las constantes correspondientes.

Para solucionar este problema se utilizan varios frascos de reacción con sus correspondientes manómetros, más el termobarómetro. En cada frasco se coloca la misma suspensión de microorganismos y diferente concentración del sustrato por estudiar.

De las curvas de DBO_e contra tiempo se determina la pendiente inicial, la cual corresponde a una concentración inicial

de sustrato y se grafican según se indica en el capítulo 3.1.

3.3 Saphromat

Sapromat es un nombre comercial del respirómetro que vende la compañía VOITH en la República Federal Alemana. Este aparato, diseñado para hacer estudios de respirometría en tratamiento de aguas de desecho, se basa en un principio diferente al de Warburg. El sapromat repone, en un frasco de reacción, el oxígeno demandado por las bacterias y otros microorganismos y lo cuantifica.

Los aparatos Sapromat pueden tener 6 ó 12 frascos de reacción, los cuales pueden, a su vez, tener un volumen de reacción de 250 a 1000 ml. El principio de funcionamiento se describe en la figura 3.3.

El frasco de reacción A contiene la suspensión de organismos en una solución nutritiva y es agitado con un agitador magnético. En la tapa se tiene un pequeño recipiente con una sustancia absorbidora de CO_2 . El recipiente de reacción se encuentra conectado al frasco generador de oxígeno por medio de una manguera y el frasco generador se encuentra unido por otra manguera a un recipiente indicador de presión. Cuando la presión baja por la demanda de oxígeno dentro del frasco A, el indicador de presión envía una señal para que el frasco

B produzca oxígeno por medio de una reacción electrolítica. La presión aumenta al aumentar la cantidad de oxígeno hasta alcanzar la presión atmosférica (presión cuando se cerró el sistema). El proceso se repite hasta que el experimento se suspenda.

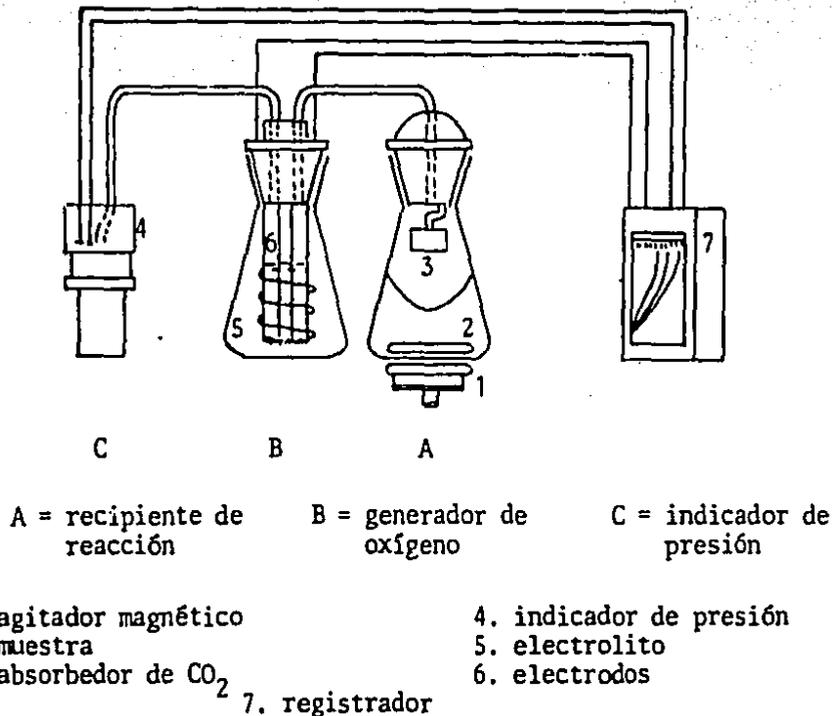


FIGURA 3.3. Diagrama del SAPROMAT.

Este método presenta las ventajas de que la experimentación se puede prolongar durante tiempo indefinido y de que no es sensible a los cambios de la presión atmosférica.

Otra gran ventaja es que el sistema de adquisición de información a través del graficador es totalmente automático y no requiere mantenimiento mientras se efectúa la experimen-

ción.

Tiene la desventaja de que la respuesta a la demanda de oxígeno es lenta y, si la concentración de sustrato es muy alta, la demanda de oxígeno puede ser más rápida que la producción electrolítica.

Los frascos A, B y C se encuentran parcialmente sumergidos en un baño de agua a temperatura constante ($\pm 0.1^{\circ}\text{C}$), lo cual garantiza que no existan desviaciones por cambios de temperatura.

Los valores que proporciona el Sapromat se dan en mg de oxígeno demandado por litro de muestra.

4. METODO EXPERIMENTAL

4.1 *Diseño del recipiente de reacción y del sistema de tracción*

Se partió de la base de que los microorganismos forman una película, por lo tanto, fue necesario tener un medio rígido sobre el cual se formara película. Por otro lado se hizo la consideración de que el mezclado requerido para poner en contacto la película con un sustrato debe proporcionarse por medio de acción mecánica y así poder desprejar los efectos de los procesos de difusión del sustrato hacia la película.

Partiendo de las consideraciones anteriores se decidió la utilización de discos como soporte de la película. Se seleccionó al vidrio con superficie esmerilada por ser un mate-

rial inerte a la acción metabólica y la superficie esmerilada permite una mejor adherencia de los organismos.

Posteriormente se consideró que se puede hacer girar al disco dentro de una solución nutritiva para poner en contacto la película biológica con el sustrato, al mismo tiempo que se produce un mezclado eficiente. De esta forma se llegó, por simplicidad, al símil con los sistemas de biodiscos para el tratamiento de aguas de desecho doméstico.

El paso siguiente consistió en el diseño de un recipiente que permitiera el montaje de los discos, así como de un sistema de tracción que hiciera girar los discos dentro del recipiente.

Como los sistemas respirométricos para efectuar determinaciones cinéticas han probado ser eficientes y confiables, se llegó a la conclusión de que el recipiente debía permitir el aislamiento de la película biológica del medio circundante para así, como un sistema cerrado, estudiar la cinética de la degradación de sustratos a través del consumo de oxígeno (ver Capítulo 3).

Como punto de partida para el diseño final se seleccionaron discos de vidrio con superficie esmerilada de 10 cm de diámetro y con un espesor de 3 mm. Cada disco con una perfora

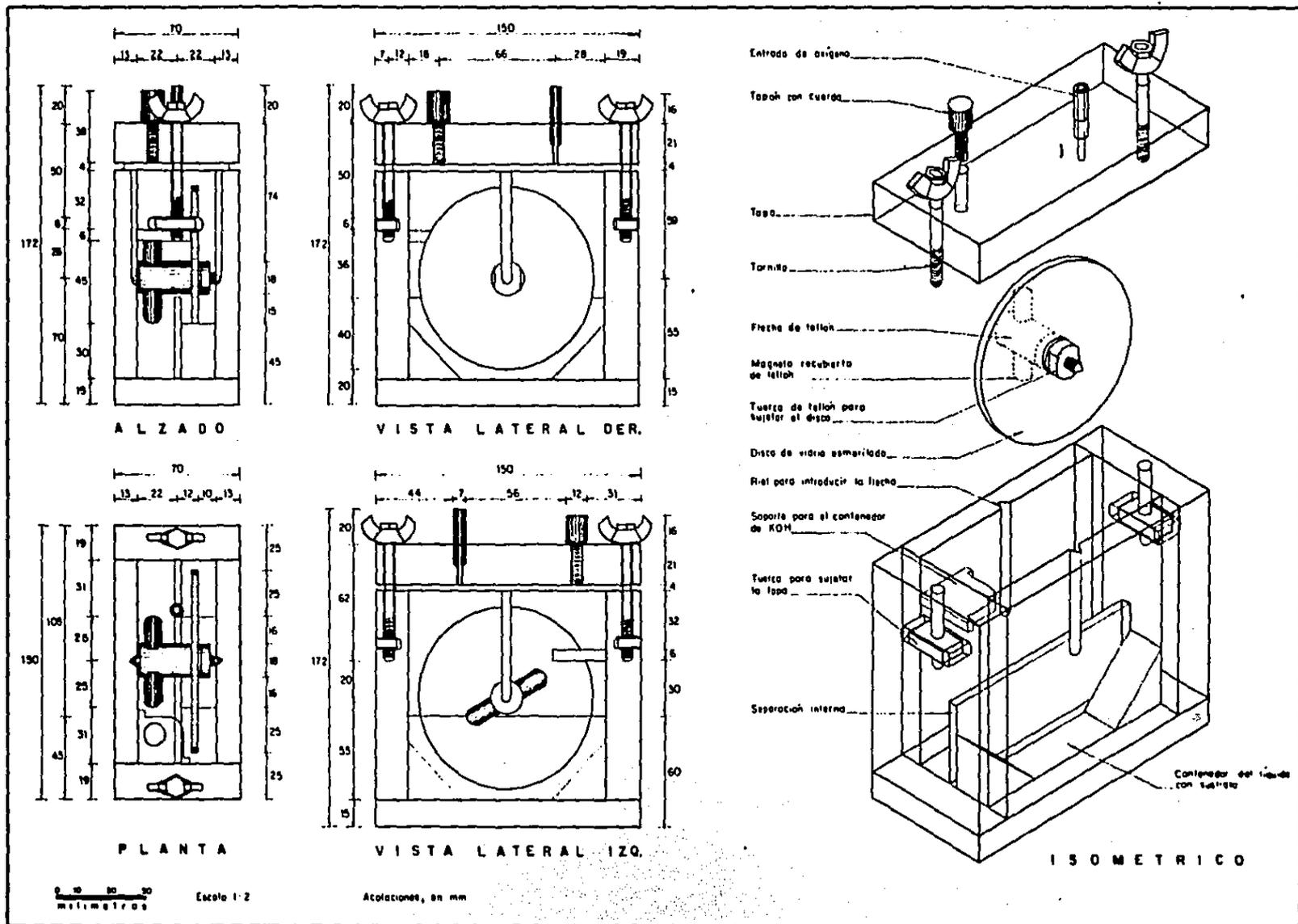


Figura 4.1 Recipientes construidos para los estudios de respirometría en películas biológicas.

ción en el centro para poderlos sujetar a una pequeña flecha sobre la cual pudieran girar.

El sistema de tracción se seleccionó de tipo magnético para poder impulsar los discos desde el exterior del recipiente sin tener necesidad de sellos herméticos en la parte de la flecha.

Después de consultar con expertos en soplado de vidrio se descartó la posibilidad de utilizar el vidrio por la complejidad de la forma que debiera tener el recipiente y se diseñaron y construyeron finalmente 6 recipientes iguales en acrílico transparente. La figura 4.1 detalla las dimensiones de cada uno de los recipientes y de cada una de las partes que los componen. También se especifica en la Figura 4.1 el funcionamiento de cada una de las partes.

En su parte inferior el recipiente está dividido en dos: una parte sirve para colocar la solución con sustrato y la otra proporciona el espacio necesario para que gire el magneto interno. Al introducirse el disco queda colocado de tal forma que la película biológica se sumerge en la solución nutritiva aproximadamente 40% de su superficie. En la parte superior interna se colocó un soporte para un pequeño recipiente de vidrio el cual se utiliza como contenedor de KOH para absorber el CO_2 producido durante las reacciones bioquí

micas.

La tapa está provista de dos perforaciones para tornillos que tienen por objeto sujetarla. También tiene otras que dos perforaciones: una de ellas sirve para conectar el recipiente al equipo de medición y la otra tiene un tapón con cuerda para introducir la solución nutritiva después de haberse estabilizado la temperatura.

El sistema de tracción consiste de 6 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, por medio de una banda accionada por un motor de velocidad variable, impulsen los magnetos acoplados a la flecha dentro del recipiente.

Los 6 recipientes se colocaron dentro de un tanque rectangular, el cual, además de los frascos, contiene agua y un dispositivo que permite el mezclado del agua y la mantiene a temperatura constante. De esta forma se logra que la reacción se lleve a temperatura constante.

4.2 Generación de la película biológica

Para lograr que los discos de vidrio se cubrieran con una película de microorganismos, éstos se colocaron, por medio de

soportes contruídos exprofeso, sobre el empaque plástico de la primera etapa del sistema de biodisco que se encuentra en la Planta para Tratamiento de Aguas de Desecho de Ciudad Unversitaria.

Por medio del microscopio se determinó el espesor de las películas, las cuales variaban entre 25 y 150 micras.

4.3 Utilización del SAPROMAT

Originalmente el SAPROMAT, al igual que el WARBURG, fue diseñado para efectuar estudios cinéticos en sistemas microbianos en suspensión. Tiene un baño de temperatura constante para frascos de forma cilíndrica, por lo cual no pudo ser utilizado dicho baño. De los frascos de generación de oxígeno se prolongaron los conductos de oxígeno por medio de mangueras de plástico transparente para poder conectar cada unidad generadora a uno de los recipientes descritos en el capítulo 4.1. Los frascos de reacción se colocan en el baño de agua para que los discos sean impulsados por el sistema de tracción.

De acuerdo con el funcionamiento del SAPROMAT el aparato proporciona el oxígeno que requieren los microorganismos y lo cuantifica y grafica con respecto al tiempo. Este aparato tiene la gran ventaja de ser automático (ver capítulo 3.3).

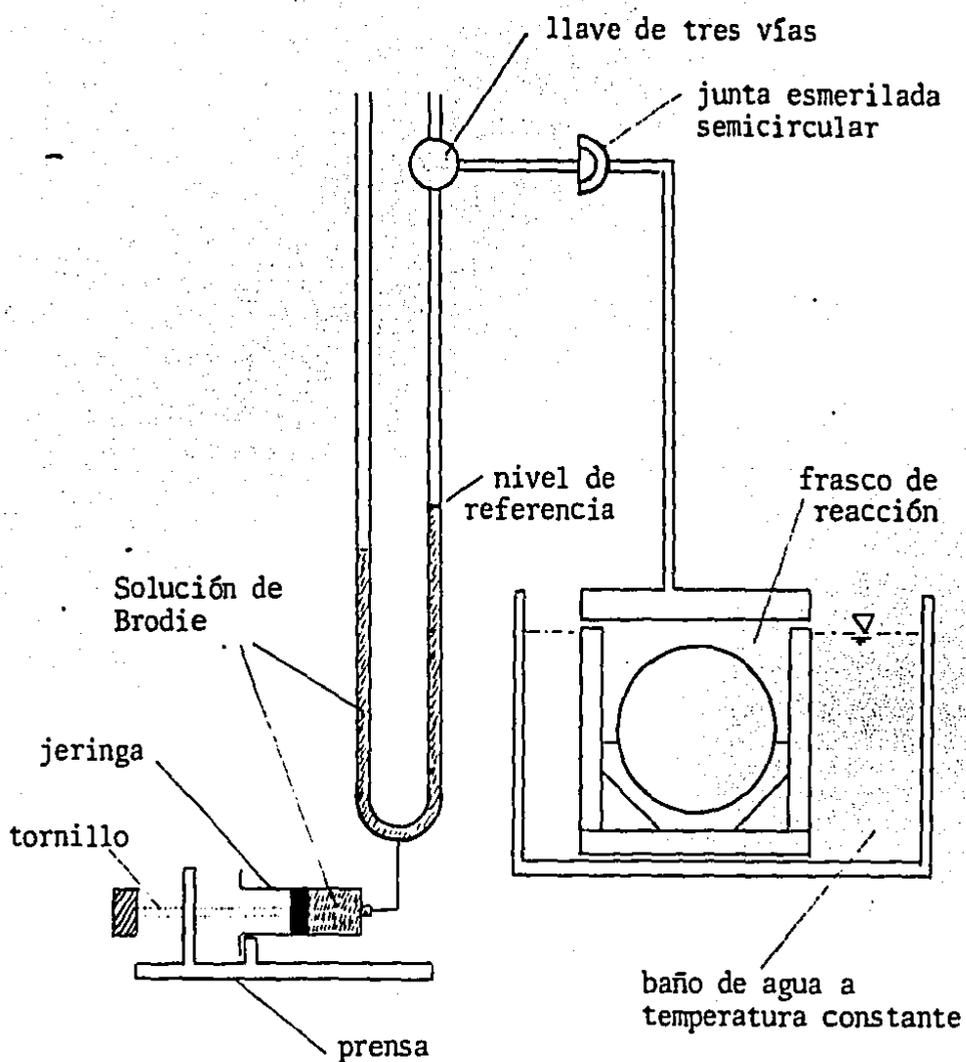


Figura 4.2 Adaptación del respirómetro de Warburg para determinaciones en películas biológicas.

4.4 Utilización del respirómetro Warburg

Como no se fabrican comercialmente respirómetros Warburg del tipo que se requería, se construyeron 6 manómetros con una longitud de tubos de 40 cm. En la parte inferior se ajustó una jeringa como recipiente de solución de Brodie accionada por una pequeña prensa de tornillo que permite mover el émbolo de la jeringa y así ajustar los niveles de líquido en el manómetro (ver figura 4.2.).

En el capítulo 3.2 se describe el funcionamiento del respirómetro Warburg y la forma de cálculo.

4.5 Determinaciones cinéticas

Según las bases de la cinética enzimática descritas en el capítulo 3, es necesario utilizar varios frascos de reacción con objeto de tener el seguimiento de la degradación de un sustrato a diferentes concentraciones. El método de Lineweaver y Burk requiere de un mínimo de 3 diferentes concentraciones y el método de Walker una sola.

Debe de considerarse, además de los 3 frascos de reacción para degradación de sustrato, un frasco más para cuantificar la respiración endógena (ver capítulo 2) y poder restarla a la respiración combinada de los frascos con sustrato. El

producto de la resta de la respiración endógena de la respiración combinada, es la respiración de sustrato, a partir de la cual se efectúan los cálculos de los parámetros cinéticos.

Por seguridad y para aumentar la precisión se utilizaron 4 frascos para estudio de la respiración por sustrato y uno más para la respiración endógena.

En el caso del aparato de Warburg es necesario un frasco más que se utiliza como termobarómetro para compensar las variaciones de las mediciones considerando los cambios en la presión atmosférica (ver capítulo 3).

4.6 *Temperatura y pH*

En todos los experimentos se ajustó la temperatura a 20 ó 25 °C por medio de un baño de agua y un termostato. El valor del pH fue ajustado a 7.2 por medio de una solución amortiguadora de fosfatos básico y dibásico de potasio en la cual se solubilizó la sustancia nutritiva (sustrato).

4.7 *Sustratos*

Con objeto de favorecer la demanda de oxígeno se utilizaron dos sustratos de fácil degradación: acetato de sodio y glucosa.

5. RESULTADOS Y DISCUSION

En este capítulo se presentan los resultados de la experimentación realizada en el SAPROMAT y en el respirómetro diseñado según se especifica en el capítulo 4.

5.1 Experimentación con el SAPROMAT

Las primeras pruebas se efectuaron utilizando el SAPROMAT para cuantificar la demanda de oxígeno.

La figura 5.1 muestra dos curvas correspondientes a la respiración de acetato de sodio después de haber restado la respiración endógena. La temperatura experimental fue de 20°C, el pH de 7.2 y el grosor de las películas de 80 μ . Las concentraciones iniciales de acetato de sodio fueron 2140 y 2860 mg/l. En la figura 5.1 se observa que la pendiente inicial

cial (rapidez de reacción) de la curva de mayor concentración es menor que la curva de menor concentración, lo cual no concuerda con la teoría de Michaelis-Menten. Según dicha teoría la rapidez de reacción (pendiente inicial) debe aumentar al aumentar la concentración inicial de sustrato hasta que se alcanza la asíntota de la curva (valor de $V_{m\acute{a}x}$) (ver figura 2.4) en donde la rapidez de reacción no aumenta al incrementar la concentración de sustrato.

El comportamiento descrito en la figura 5.1 es un caso de inhibición por exceso de sustrato, tal como lo describe Wilderer (1976). Conforme aumenta la concentración inicial de sustrato disminuye la pendiente inicial de las curvas, lo cual no afecta el consumo final de oxígeno (DBO_f). La figura 5.2 muestra los valores de DBO_f para las dos curvas contra la concentración inicial de sustrato. Se observa que los dos valores caen sobre una recta que pasa por cero y cuya pendiente es de 0.27 mgO_2 demandado por cada mg de acetato consumido.

Las figuras 5.3 y 5.4 muestran las gráficas de la ecuación de Henri linearizada, también conocida como ecuación de Walker. Después de efectuar una regresión lineal se obtiene una recta para cada una de las dos curvas a partir de las cuales es posible obtener los valores de $V_{m\acute{a}x}$ y de K_m . Los resultados se resumen en la Tabla I.

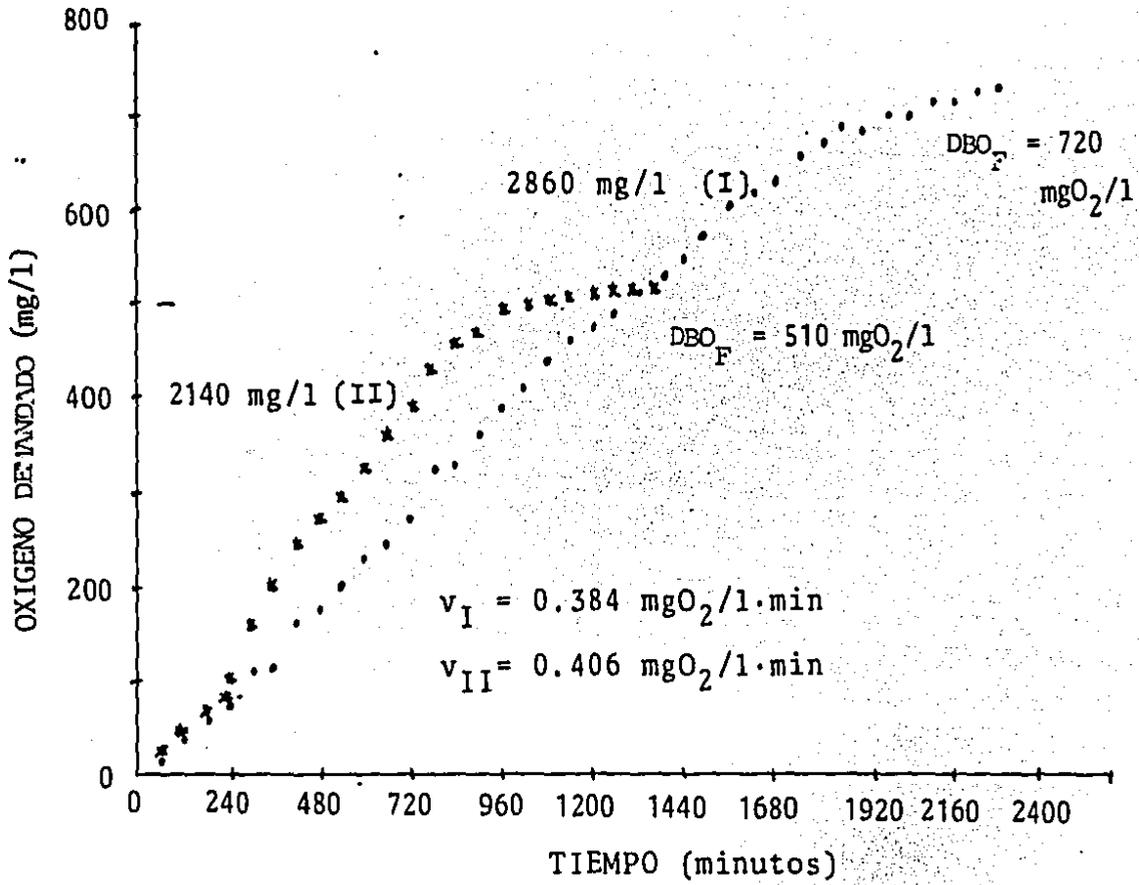


Figura 5.1. Demanda de oxígeno durante la degradación de acetato de sodio. $T = 20^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 7.2$.

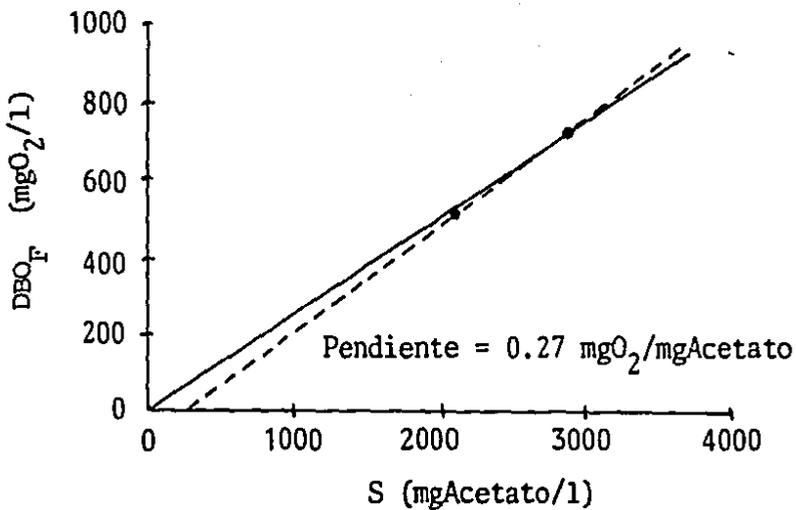


Figura 5.2. Determinación del consumo específico de oxígeno.

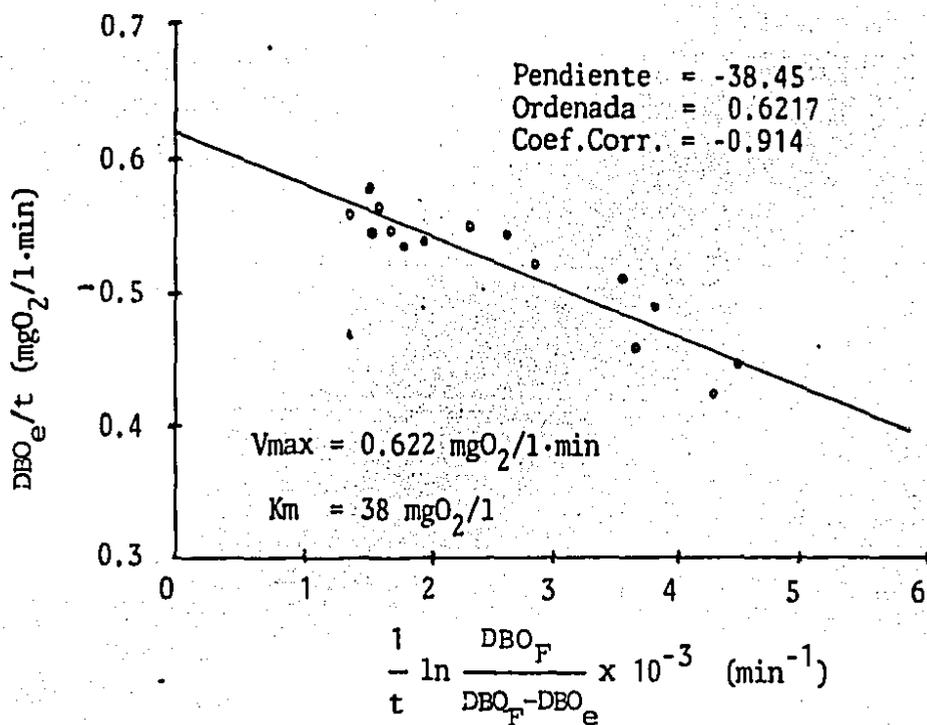


Figura 5.3 Diagrama de Walker para una concentración inicial de 2140 mg/l de acetato de sodio.

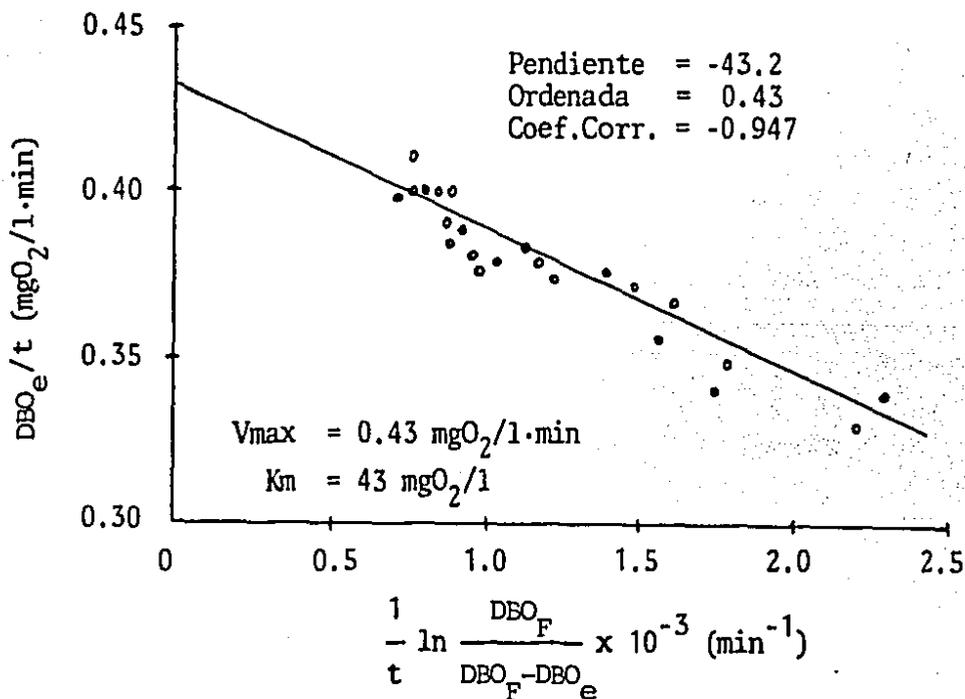


Figura 5.4 Diagrama de Walker para una concentración inicial de 2860 mg/l de acetato de sodio.

TABLA I. VALORES DE $V_{m\acute{a}x}$ Y K_m DE LAS CURVAS OBTENIDAS EN EL SAPROMAT DURANTE LA DEGRADACION DE ACETATO DE SODIO

Concentración inicial de acetato de sodio (mg/l)	Pendiente inicial (mgO ₂ /l·mín)	$V_{m\acute{a}x}$ (mgO ₂ /l·mín)	K_m (mgO ₂ /l)
2140	0.406	0.62	38
2860	0.384	0.43	43

La diferencia entre los valores de K_m es tan pequeña que pueden considerarse como error del método experimental. No sucede lo mismo con los valores de $V_{m\acute{a}x}$.

Cuando se presenta inhibición por exceso de sustrato la ecuación de Michaelis-Menten se transforman en (Wilderer, 1976; Segel, 1976):

$$v = \frac{V_{m\acute{a}x}}{1 + \frac{S}{K_i}} \cdot \frac{S}{K_m + S} \quad (15)$$

donde K_i es la constante de inhibición.

El resultado obtenido de las curvas de la figura 5.1 significa que los valores de $V_{m\acute{a}x}$ son realmente el valor de $V_{m\acute{a}x}/(1 + S/K_i)$ y que dependen de una variable que es la concentración de sustrato. La figura 5.5 representa el comporta

miento de la ecuación de Michaelis-Menten utilizando los valores de la Tabla I. En la misma figura se indican los valores de la pendiente inicial de las dos curvas y se observa que se encuentran más cerca de la curva correspondiente a la concentración inicial de acetato de 2860 mg/l, por lo cual se considera que esa última curva es más representativa del fenómeno que la de concentración menor.

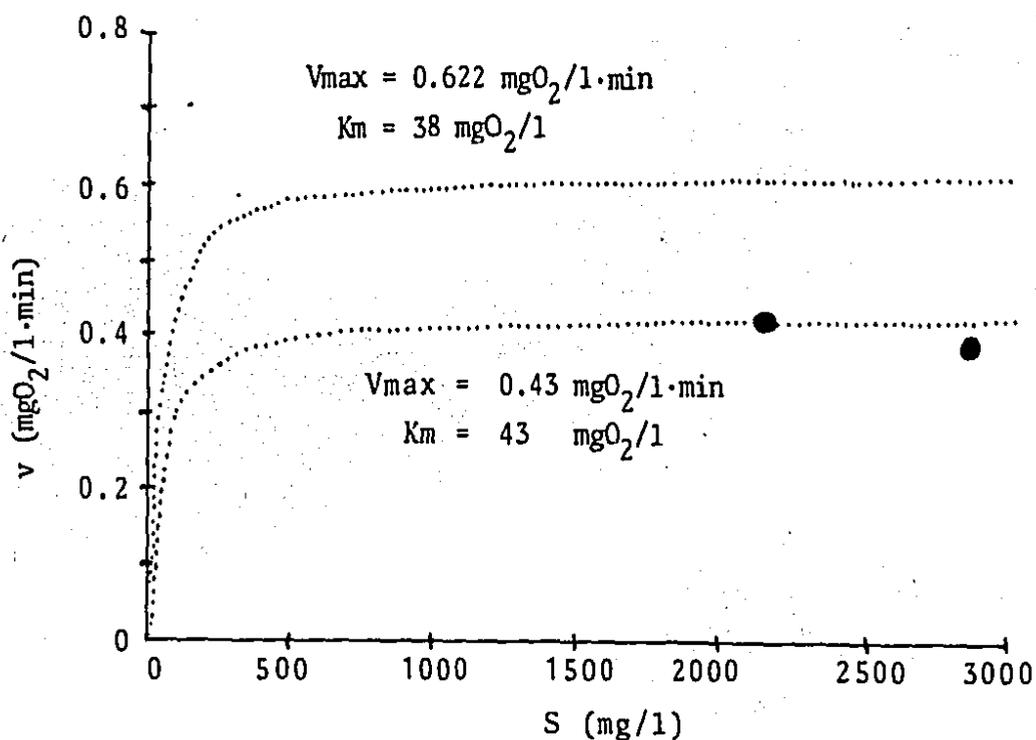


Figura 5.5. Representación gráfica de la ecuación de Michaelis-Menten utilizando los valores de la Tabla I.

Por lo anteriormente expuesto se concluye que los valores confiables de los parámetros cinéticos corresponden a la curva con concentración inicial de 2860 mg/l.

Durante la experimentación se pudo observar que el espesor de la película disminuye en un 70% como promedio después de 48 horas.

La disminución se observó en los frascos con acetato de sodio y en el de respiración endógena. Por lo anterior se concluye que las concentraciones de acetato de sodio deben ser menores para que el tiempo que dura la reacción también sea menor y no sea necesario trabajar con la incertidumbre de que el espesor de la película sea un factor que afecte el análisis de la cinética. Como el SAPROMAT no permite reducir los tiempos de reacción a algunas horas, se continuó la experimentación utilizando el respirómetro WARBURG construido especialmente para el caso.

5.2 Experimentación con el respirómetro WARBURG

Se efectuaron pruebas de respirometría en el WARBURG utilizando dos sustratos: acetato de sodio y glucosa.

5.2.1 Degradación de acetato de sodio

Se hizo experimentación utilizando acetato de sodio como sustrato y se obtuvieron curvas de consumo de oxígeno para diferentes concentraciones del mismo (ver figura 5.6). La película biológica utilizada tuvo en promedio un espesor de 30 μ ;

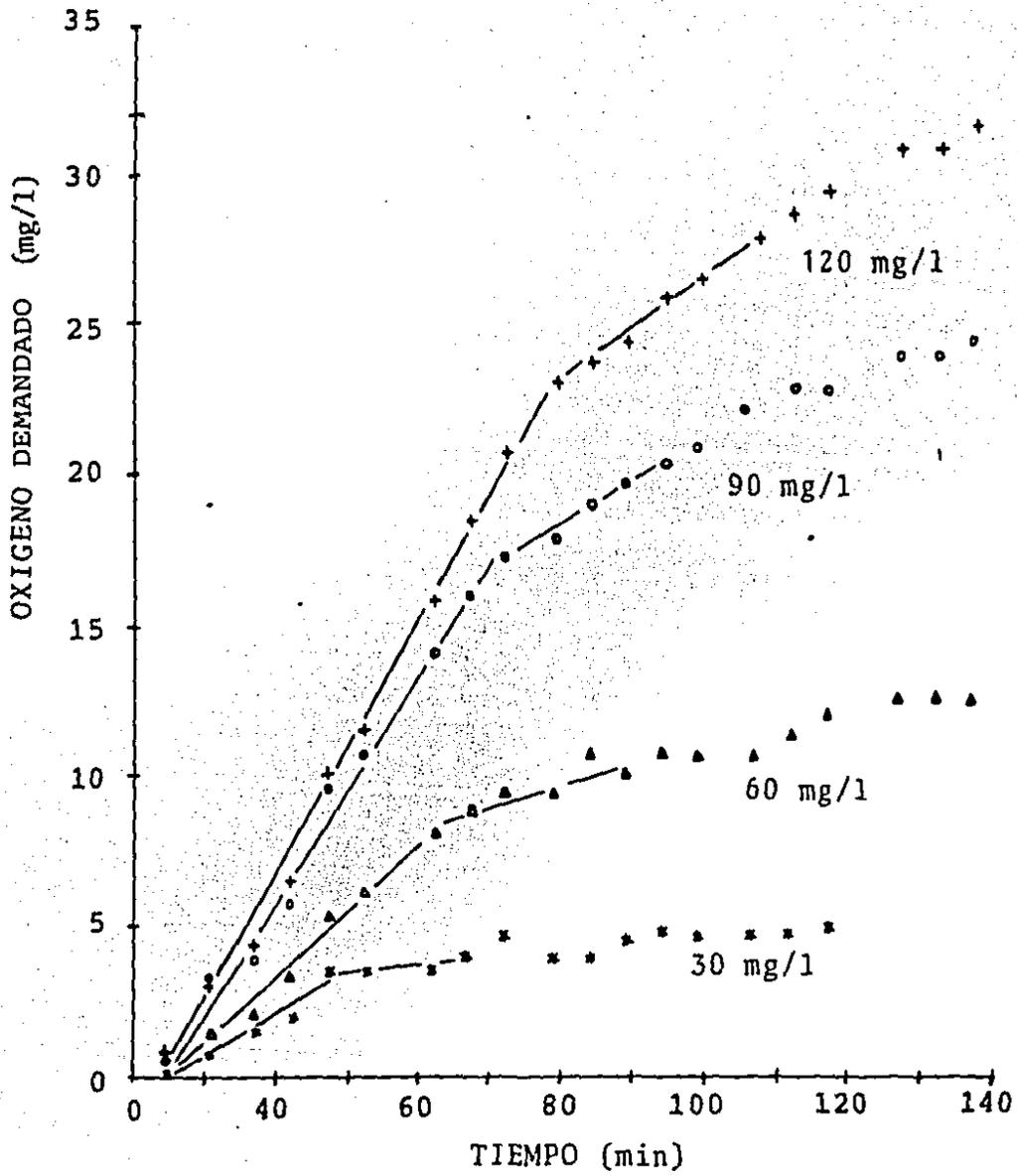


Figura 5.6. Curvas de demanda de oxigênio para diferentes concentrações de acetato de sódio. $T = 20^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 7.2$.

la temperatura se mantuvo constante a 25°C y el pH fue de 7.2.

En la figura 5.6 se observa que la demanda bioquímica de oxígeno (DBO) aumenta al aumentar la concentración de sustrato. De igual forma se observa que la pendiente inicial de las curvas aumenta al aumentar la concentración (ver Tabla II).

TABLA II. VALORES DE DBO_F Y DE v OBTENIDOS A PARTIR DE LA FIGURA 5.6.

Concentración inicial de acetato de sodio (mg/l)	DBO_F (mgO_2/l)	Pendiente v ($mgO_2/l \cdot min$)	Inicial Coefi. Corr.
30	3.5	0.136	0.976
60	9.5	0.213	0.991
90	17.5	0.364	0.993
120	23.0	0.444	0.993

Graficando los valores de DBO_F de la figura 5.6 contra la concentración inicial de sustrato se obtienen la figura 5.7 de la Tabla II. La pendiente de la recta que forman los puntos da el valor del consumo específico de oxígeno para la degradación de acetato de sodio. El hecho de que la ordenada al origen tenga un valor negativo significa que la respiración endógena no es exactamente igual con o sin sustrato; cuando los microorganismos degradan acetato de sodio la res-

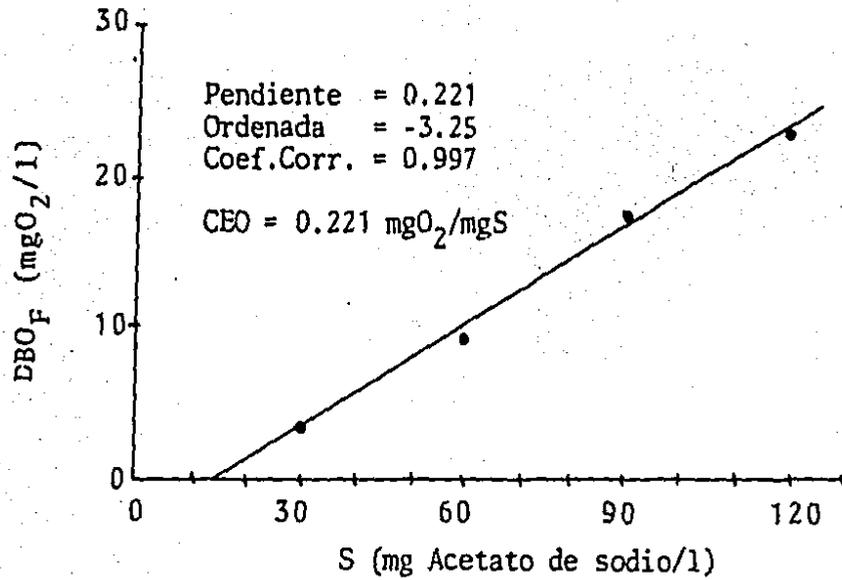


Figura 5.7 Obtención del consumo específico de oxígeno (CEO) para acetato de sodio.

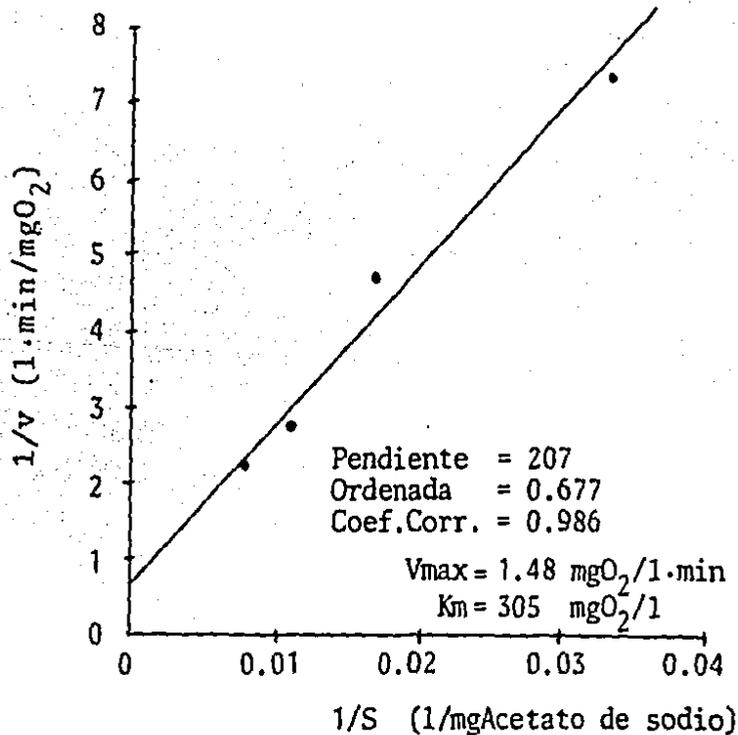


Figura 5.8 Representación gráfica de la linearización de Lineweaver-Burk a partir de los datos de la figura 5.6 y de la Tabla II.

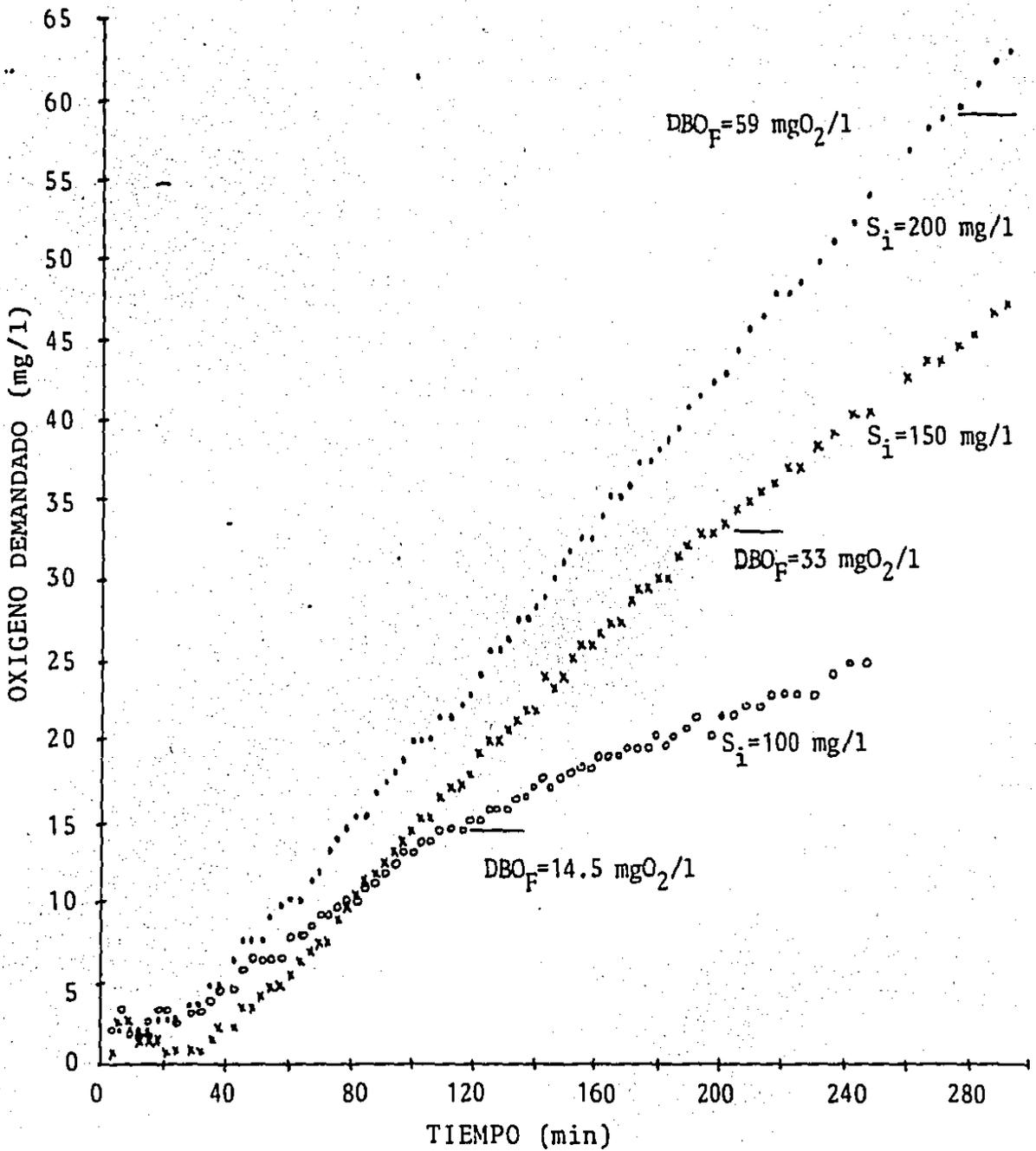


Figura 5.9 Curvas de demanda de oxígeno durante la degradación de glucosa. $T = 25^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 7.2$.

En la figura 5.10 se muestran los valores de DBO_F contra la concentración inicial (ver Tabla III). El valor de consumo específico de oxígeno es de $0.41 \text{ mgO}_2/\text{mg}$ glucosa y se puede observar que es mayor que para el acetato de sodio, lo cual significa que los microorganismos requieren una mayor cantidad de oxígeno para degradar glucosa que acetato de sodio. De forma similar al acetato de sodio, la ordenada al origen es negativa. Esto significa que la respiración endógena es superior cuando los microorganismos no tienen un sustrato que degradar o bien, dicho de otra forma, la respiración endógena se ve abatida cuando hay un sustrato en el medio.

TABLA III. VALORES DE DBO_F Y DE v OBTENIDOS A PARTIR DE LA FIGURA 5.9.

Concentración inicial de glucosa (mg/l)	DBO_F (mgO_2/l)	Pendiente Inicial v ($\text{mgO}_2/\text{l} \cdot \text{min}$)	Coef. Corr.
100	14.5	0.1426	0.995
150	33.0	0.208	0.998
200	59.0	0.238	0.999

La figura 5.11 muestra la gráfica de los valores de los inversos de las pendientes iniciales contra las concentraciones iniciales según la linearización de Lineweaver y Burk. De esta figura se obtienen los valores de 0.84 para $V_{m\acute{a}x}$ y de 483 para K_m . Al ser la molécula de glucosa más compleja

que la de acetato de sodio es de esperarse que el valor de K_m sea mayor para glucosa que para acetato de sodio, ya que requiere más pasos para su degradación. De la misma forma se tiene que la rapidez de degradación no puede ser superior a la del acetato de sodio y eso se refleja en los valores de $V_{m\acute{a}x}$: la rapidez de degradación de glucosa debe ser menor que la de acetato de sodio.

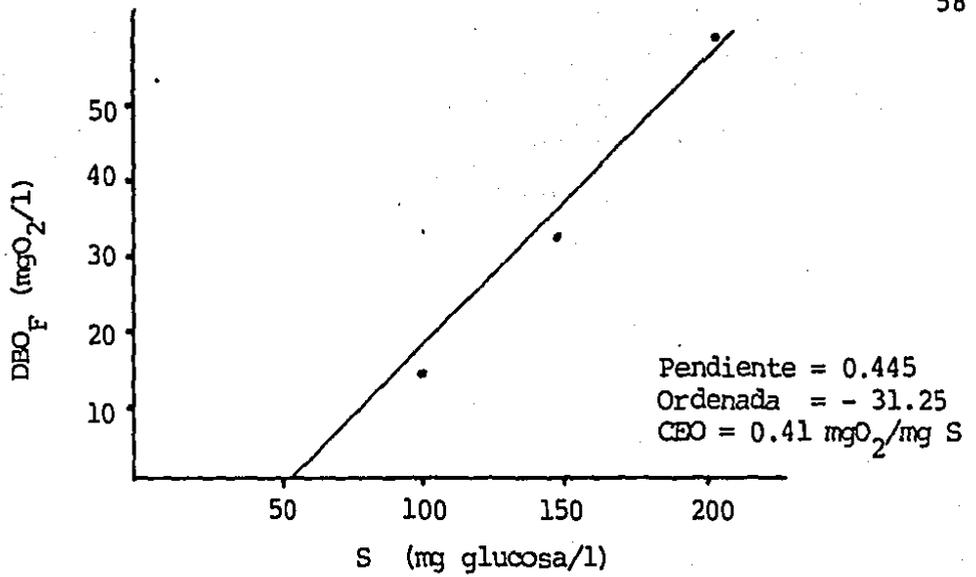


Figura 5.10. Obtención del Consumo Específico de Oxígeno (CEO) para glucosa.

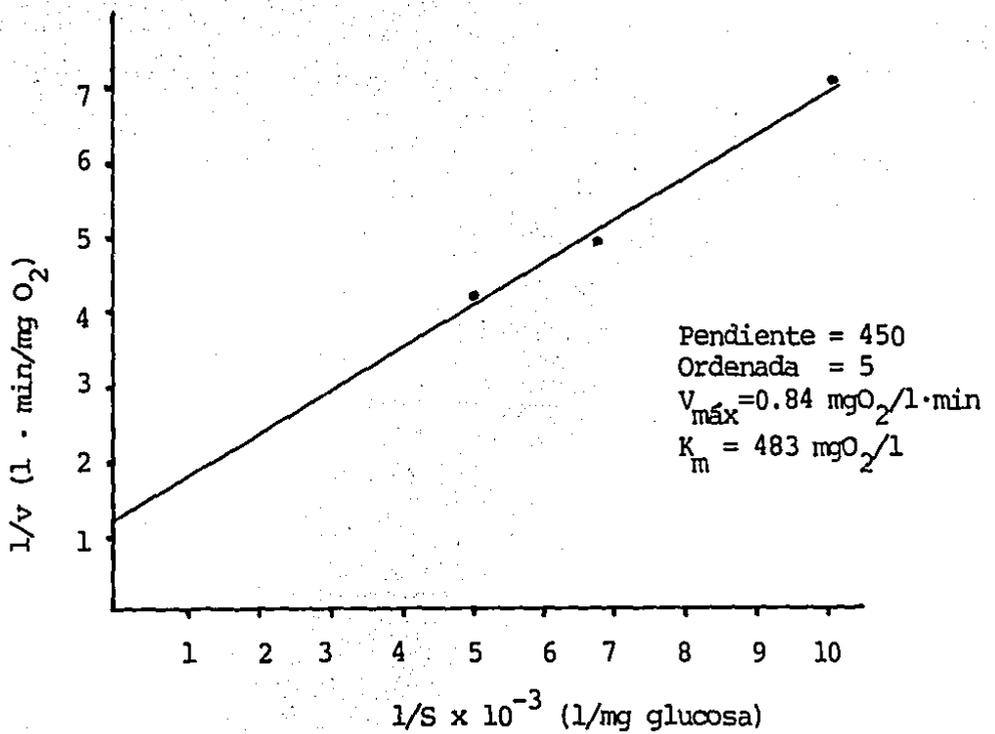


Figura 5.11. Representación de Lineweaver-Burk para glucosa. A partir de los datos de la figura 5.9 y de la Tabla III.

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Las conclusiones que se desprenden de este trabajo son:

1. Las películas biológicas generadas sobre los discos de vidrio esmerilado tienen una buena adhesión y aunque su homogeneidad no es completamente satisfactoria sí es igual a la de la película del biodisco.
2. Los recipientes diseñados como frascos de reacción, los discos de vidrio esmerilado y el sistema de tracción tienen un funcionamiento satisfactorio.
3. El sistema productor y medidor de oxígeno del Sapromat reacciona lentamente no permitiendo efectuar mediciones en tiempos menores de 8 a 10 horas. Este hecho obliga a

la utilización de altas concentraciones de sustrato para prolongar el tiempo de reacción.

4. La medición del oxígeno demandado por medio de manómetros (principio del aparato Warburg) permite el uso de concentraciones bajas de sustrato para lograr tiempos de reacción desde algunos minutos hasta varias horas.
5. El método desarrollado permite analizar confiablemente el comportamiento de películas biológicas durante la degradación de sustratos.

Con objeto de obtener más información sobre la cinética de películas biológicas durante la degradación de sustratos complejos, tales como los contenidos en aguas de desecho, se hacen las siguientes recomendaciones:

1. Para evitar posibles problemas de fugas en los frascos de reacción se recomienda construirlos con vidrio o de una sola pieza con materiales sintéticos (acrílico o resinas).
2. Es necesario estudiar los efectos de la difusión de sustrato al interior de la película de forma simultánea con su degradación.

De las determinaciones cinéticas realizadas se desprende la siguiente información:

Determinaciones cinéticas con el Sapromat

Degradación de acetato de sodio. El exceso de sustrato puede inhibir la reacción; así, la $V_{máx}$ se ve disminuída. Esto, hace necesario el cambio del respirómetro al Warburg, donde se hacen mediciones rápidas, 2 ó 3 horas con cantidades pequeñas de sustrato.

El tiempo requerido en el Sapromat, aproximadamente 36 horas, permite la disminución del grosor de la película durante la experimentación, introduciendo un factor de incertidumbre.

Determinaciones cinéticas con el Warburg

Degradación de acetato de sodio. Se llevó a cabo la experimentación en un tiempo razonablemente corto -140 minutos-; así se evita la disminución del grosor de la película eliminando ese factor de incertidumbre. Se puede trabajar con concentraciones pequeñas de sustrato evitando la inhibición de la reacción por exceso del mismo.

Dado que se trabajó a 25°C (a diferencia de 20°C en el Sapro-

mat) con el fin de acelerar la reacción, se obtuvo una $V_{m\acute{a}x}$ de concentraciones muy bajas (Williamson y Mc Carty, 1976a); cuando las concentraciones de sustrato, en cambio, son muy altas, puede presentarse el fenómeno de inhibición de la reacción de la degradación (Wilderer, 1976).

Existe evidencia de que el grosor de la película es un factor que afecta la cinética de la degradación de sustratos; dos teorías se han propuesto para determinar los efectos del grosor de la biopelícula sobre la remoción de nutrientes: la primera, propuesta por Sanders (citado por Hoehn y Ray, 1973), considera que cuando la película es gruesa y presenta una capa basal anaerobia, la fermentación de los productos liberados por los organismos basales, pueden llegar a las capas aerobias proveyendo sustrato, sumándose al que la película obtiene a través de su superficie proveniente del exterior; y, la segunda, propuesta por Maier; Kornegoy y Andrews; y Tomlinson y Sanddon, (citados por Hoehn y Ray, 1973), propone que hay un grosor limitante al cual la tasa de remoción de nutrientes será máxima y permanecerá constante más allá de ese grosor, porque existe una capa activa de microorganismos en la superficie de la película que es responsable del total de la remoción de sustrato que ocurre. Las dos teorías no son mutuamente excluyentes.

Se considera que la película biológica alcanza el estado ca-

si estable cuando la película presente 300 ó 400 μ de grosor, y, no puede aumentar el grosor porque el oxígeno no se difunde a las capas inferiores, más allá de ese grosor. Los valores de K_m difieren también por las diferencias de temperatura y de espesor de la película, dado que, ambos factores afectan la difusión del sustrato.

Degradación de glucosa. La DBO es mayor que para acetato de sodio, al igual que la K_m mientras que, la $V_{m\acute{a}x}$ es menor porque la reacción es más lenta.

Siguiendo las recomendaciones al método y tomando en cuenta las determinaciones cinéticas preliminares, se desprende la necesidad de precisar resultados; así, se propone un diseño experimental utilizando como sustratos al acetato de sodio porque su degradación es más rápida que la de la glucosa; y al agua de desecho doméstico de la planta de tratamiento de Ciudad Universitaria por fines prácticos por su posible aplicación en el diseño de operación del biodisco de dicha planta.

El objeto de estudio de nuestra investigación es la determinación de la cinética de películas biológicas; así, se recomienda un estudio complementario alrededor de dicha determinación. Los objetivos de la investigación que se plantea son: 1) Utilizando la ecuación de Michaelis-Menten, descri

bir la influencia de la concentración de acetato de sodio y aguas residuales domésticas sobre la cinética de degradación de sustratos por películas biológicas rotatorias; y, 2) de terminar el efecto del grosor de la película biológica en la cinética de degradación de sustratos.

Utilizando el método desarrollado, construido y probado en la presente tesis, será posible estudiar y conocer la cinética de degradación de sustratos por películas biológicas utilizadas en sistemas de biodisco para el tratamiento de agua de desecho doméstico. Se considera que los conocimientos resultantes serán un valioso aporte en el diseño y operación de éstos sistemas.

7. APENDICE

El objeto de estudio de la tesis aquí presentada es la determinación de la cinética de películas biológicas; aquí se propone una investigación complementaria; los objetivos del estudio que se plantea son: 1) utilizando la ecuación de Michaelis-Menten, describir la influencia de la concentración de acetato de sodio y aguas residuales domésticas sobre la cinética de degradación de sustratos por películas biológicas rotatorias; y, 2) determinar el efecto del grosor de la película biológica en la cinética de degradación de sustratos.

Existe un gran número de estudios relacionados con la determinación de coeficientes globales cinéticos en contactores biológicos rotatorios (biodisco). La forma general de describir la cinética global de estos sistemas, se basa en la

aplicación de balances de materia en el sistema completo (Nourozian, y Deloya, 1984).

Pocas investigaciones se han llevado a cabo para estudiar el comportamiento bioquímico de películas biológicas. Algunas de ellas han sido realizadas para analizar los efectos físicos sobre la película, tales como la fricción del líquido sobre los coeficientes difusionales en ella (Truelar y Characlis, 1982), o para analizar el consumo de nutrientes a través de la película considerando la actividad microbiana como factor limitante (Kornegay, 1968).

De los modelos encontrados en la literatura, los más generales son los de Truelar y Characlis (1982). Ninguno de los modelos cinéticos incluye en su discusión una determinación experimental en un modelo físico igual o similar al real o bien, una aplicación posterior que permita la optimización del diseño de los sistemas de tratamientos estudiados.

Las concentraciones muy bajas de sustrato pueden ser factores limitantes de la degradación dado que no hay actividad significativa de la película por su incapacidad de extraer energía (Hoehn y Ray, 1973). El estado estable corresponde a un estado definido microbiológicamente de una población; constituye un valioso instrumento experimental y es una condición que se encuentra en los medios más estables como el

mar profundo o el suelo bajo un bosque maduro (Odum, 1982).

Diseño experimental

Primero, se llevan a cabo varias series de experimentos; cada una de ellas con diferente grosor de película, utilizando acetato de sodio como sustrato. Posteriormente, se realizan otras series, cambiando el sustrato por diferentes diluciones de agua de desecho doméstico de la Planta de Tratamiento de Aguas de Desecho de Ciudad Universitaria.

Determinación de la concentración del sustrato y del grosor de la película

Se sugieren concentraciones de 30, 60, 90 y 120 mg/l de acetato de sodio porque ya fueron probadas en esta tesis; se evita de esta manera la inhibición de la rapidez de reacción por exceso del mismo (Wilderer, 1976); y, se asegura que la concentración menor no sea tan pequeña que pueda resultar un factor limitante de la reacción (Williamson y Mc Carty, 1976b). Las diluciones de agua residual se calcularán a partir de experimentos preliminares.

Se sugiere asimismo, que el grosor de la película sea de 50, 100, 200, 300 y 400 μ se considera que a los 300 ó 400 μ la

película se encuentra en estado casi-estable (Hoehn y Ray, 1973).

La biopelícula se genera en la primera etapa del biodisco de la Planta de Ciudad Universitaria, para que tenga las características de dicho sistema, en esa etapa.

Se mantendrán como constantes la temperatura (25°C) y el pH (7.2).

Alcances

Utilizando el método desarrollado en la presente tesis será posible conocer más ampliamente el comportamiento cinético de películas biológicas rotatorias utilizadas en el tratamiento de aguas de desecho domésticas.

Se considera que los resultados del estudio propuesto serán un valioso aporte en el diseño y operación de sistemas de biodisco para tratamiento de agua de desecho doméstico.

BIBLIOGRAFIA

1. Aguirre, J. 1986. "Tratamiento y reuso de las aguas residuales de Ciudad Universitaria". México, Tesis, Facultad de Ingeniería, UNAM. 78 p.
2. Alleman, J.E.; Veil, J.A. y Canaday, T.J. 1982. "Scanning electron microscope evaluation of rotating biological contactor biofilm". Water Res. 16:543-550.
3. Benefield, L.O. y Randall, C.W. 1980. "Biological process design for wastewater treatment". Prentice-Hall (Inc. Englewood Cliffs) Series in Env. Sci. p. 410-420.
4. Bryers, J.D. 1982. "Process involved in early biofilm formation". First International Conference on Fixed-Film Biological Processes, King Island, Ohio, April 20-23.
5. Christensen, H.N. y Palmer, G.A. 1980. "Cinética enzimática". México, Editorial Reverté, S.A.
6. Engelmann, G. 1978. "Untersuchungen zur Wirkung von Schwermetallsalzen auf Gewaesserbiocoenosen". Cuaderno técnico, Institut fuer Ingenieurbiologie, Universidad de Karlsruhe, Rep. Fed. Alemana.

7. Gaudy, A.F.; Yang, P.Y.; Bustamante, R. Y Gaudy, E.T. 1973. "Exponential growth in systems limited by substrate concentration". *Biotech. Bioeng.*, 25:589-596.
8. Grady, C.P. 1982. "Modelling of biological fixed-film-a state-of-the-art-review". First International Conference on Fixed Film Biological Processes, King Island, Ohio, April 20-23.
9. Harremoës, P. 1978. "Biofilm kinetics". In *Water Pollution Microbiology*, Vol. 2, editado por Ralph Mitchell, John Wiley & Sons, New York.
10. Hartmann, L. 1971. "Reaktionskinetische analyse mikrobiologischer Vorgaenge" *Zbl. Bakt., I, Abt. Orig.* 216, 255-267.
11. Hoehn, R.C. y Ray, A.D. 1973. "Effects of thickness on bacterial films". *JWPCF*, 45: 2302-2320.
12. Kornegay, B.H. y Andrews, J.F. 1968. "Kinetics of fixed-film biological reactors". *JWPCF* 40: 460-468.
13. La Motta, E.J. 1976. "Kinetics of growth and substrate uptake in a biological film system". *Appl. and Environ. Microbiol.* 31: 268-293.

14. Lehninger, A.L. 1976. "Bioquímica" Barcelona, Omega, 887 p.
15. Metcalf & Eddy, 1977. "Tratamiento y depuración de las aguas residuales". Barcelona, Editorial Labor, Técnicas Básicas de Ingeniería, 837 p.
16. Montejano, F.; Murguía, E. y List, M. 1968. "Planta de tratamiento de aguas negras en Ciudad Universitaria, México". México, Instituto de Ingeniería, Publicación Azul, UNAM. 13 p.
17. Moreno-Rodríguez, G. "Análisis Protozoalógico de un sistema de Biodiscos empleado en la Planta de Tratamiento de C.U.". México, Tesis, Facultad de Ciencias, UNAM, 1985, 90 p.
18. Morris, J.G. 1976. "Fisicoquímica para biólogos". México, Reverté, 2a. Ed., 389 p.
19. Norouzian M.Y. 1984. "The microbiology of fixed-film processes". México, Instituto de Ingeniería, UNAM, 12 p.

20. Norouzian, M.Y. y Deloya, A. 1984. "A microbiol study of a structurally modified RBC system". en Proceedings of the second of the International Conference of Fixed-Film Biological Processes, USA, 10-12.
21. Odum, E.P. 1982. "Ecología", México, Interamericana, 3a ed., 639 p.
22. Peters R.W. y Alleman, J.E. 1982. "The history of fixed-film wastewater treatment systems". First of International Conference on Fixed-Film Biological Processes. 1:60.
23. Rittman, B.E. y Mc Carty, P.L. 1978. "Variable-order model of bacterial film kinetics". Proceedings of the American Society of Civil Engineers Conference, 104: EE5.
24. Rittman, R.W. y Mc Carty, P.L. 1980(a). "Model of steady-state-biofilm kinetics". Biotech. Bioeng. 22:2343-2357.
25. Rittman, B.E. y Mc Carty, P.L. 1980(b). "Evaluation of steady-state-biofilm kinetics". Biotech. Bioeng. 22: 2359-2373.
26. Segel, I.H. 1976. "Enzyme kinetics". John Wiley and

Sons, Nueva York.

27. Truelar, M.G. y Characlis, W.G. 1982. "Dinamics of bio film processes". JWPCF. 54:1288-1301.
28. Wilderer, P.A. 1976. "Reaktionskinetik in der biologischen abwasseranalyse". Informe técnico No. 8, Institut fuer Ingenieurbiologie, Universidad de Karlsruhe, Rep. Fed. Alemana.
29. Williamson, K. y Mc Carty, P.L. 1976(a). "A model of substrate utilization by bacterial films" JWPCF, 48:9-24.
30. Williamson, K. y Mc Carty, P.L. 1976(b). "A model of substrate utilization by bacterial films", JWPCF 48:281-296.
31. Wuhrmann, K. 1964. "Grudlagen fuer die dimensionierung der belueftung bei belebtschlammanlagen", Schweis. Z. Hydrol. 26: 310-337.