



01177
10
28

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Facultad de Ingeniería

**BIODEGRADACION DE DETERGENTES EN
PELICULA BIOLOGICA PARA UN
SISTEMA DE BIODISCOS**

MIRIAM BETH ARREORTUA COSMES

TESIS

**PRESENTADA A LA DIVISION DE ESTUDIOS DE
POSGRADO DE LA
FACULTAD DE INGENIERIA**

**DE LA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**COMO REQUISITO PARA OBTENER
EL GRADO DE**

**MAESTRO EN INGENIERIA
(AMBIENTAL)**

DIRECTOR : DR. SIMON GONZALEZ MARTINEZ



CIUDAD UNIVERSITARIA

1 9 9 6

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**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.



**COMISION NACIONAL
DEL AGUA**

**EL PRESENTE TRABAJO SE IMPRIMIO CON EL APOYO DE
LA COMISION NACIONAL DEL AGUA**

AGRADECIMIENTOS

Cuando uno finaliza un trabajo, logra darse cuenta de todo lo que falta por recorrer. En ocasiones llegar a la meta cuesta mucho trabajo y se desearía no haber iniciado; sin embargo, son estas experiencias las que nos hacen crecer y seguir adelante.

Ahora que finalizo me siento muy satisfecha de haberlo logrado y le quiero expresar todo mi agradecimiento y cariño a *mis padres*, quienes me han apoyado y orientado a lo largo de mi vida, y más aún por la paciencia y cariño infinito que solo ellos me pueden dar, muchas gracias.

Muchas gracias al Dr. Simón González por su apoyo y dirección a lo largo de mi trabajo, así como su actitud, siempre positiva, para continuar con nuestros proyectos.

Mis gracias más sinceras a los miembros del jurado quienes han hecho sugerencias para mejorar esta tesis, de las cuales muchas han sido incluidas en ella.

Con especial cariño y agradecimiento a *Claudia Nava* por su apoyo y paciencia en todo el desarrollo de esta tesis. Gracias a *Genogeno* que además de ser una gran amiga contribuyó en la parte computacional de ésta.

En cuanto a los operadores de la Planta de Aguas Residuales de Ciudad Universitaria, a los compañeros encargados de los materiales de laboratorio y los talleres, basta decir que sin su colaboración esta tesis no habría existido.

Gracias a todos mis compañeros del instituto de Ingeniería quienes generan un ambiente de cordialidad y cooperación que motiva a seguir intentando.

A la señorita Ángeles Prado, al Ing. Antonio Dávila y al Ing. Heras por su preocupación y apoyo constante en la finalización de mi trabajo, mi más sincero agradecimiento.

Me gustaría mencionar a todos y cada uno de mis compañeros y amigos que he encontrado en todo este tiempo, sin embargo faltaría espacio para mencionarlos, todos de una u otra manera han contribuido en la formación de mi carácter, y en sentirme apoyada en los momentos de frustración y crisis que uno tiene que superar.

Al Instituto de Ingeniería de la UNAM, Instituto de Tecnología del Agua y a la Comisión Nacional de Agua por las facilidades proporcionadas durante la elaboración de este trabajo. Gracias

Miriam Beth

CONTENIDO

| | Página |
|---|-----------|
| 1 INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1 <i>Problemática</i> | 2 |
| 1.2 <i>Efecto de los tensoactivos en el hombre</i> | 5 |
| 2 OBJETIVOS Y ALCANCES | 15 |
| 2.1 <i>Objetivo particulares</i> | 15 |
| 2.2 <i>Alcances</i> | 16 |
| 3 DETERGENTES EN AGUAS RESIDUALES | 17 |
| 3.1 <i>Historia</i> | 17 |
| 3.2 <i>Clasificación</i> | 18 |
| 3.2.1 <i>Composición y características fisico-químicas</i> | 19 |
| 3.3 <i>Estructuras</i> | 20 |
| 3.3.1 <i>Tensoactivos</i> | 22 |
| 3.3.1.1 <i>Sulfatados</i> | 22 |
| 3.3.1.2 <i>Sulfonatados</i> | 23 |
| 3.3.2 <i>Tensoactivos no iónicos</i> | 24 |
| 3.3.3 <i>Tensoactivos catiónicos</i> | 24 |
| 3.3.4 <i>Tensoactivos anfóliticos</i> | 25 |
| 3.3.5 <i>Tensoactivos zwitteriónicos</i> | 25 |
| 3.4 <i>El problema de los fosfatos</i> | 25 |
| 3.5 <i>Antecedentes en los procesos de degradación bacteriana</i> | 26 |
| 4 BIODISCO | 33 |
| 4.1 <i>Aguas residuales</i> | 34 |
| 4.1.1 <i>Fuentes de generación</i> | 34 |
| 4.1.2 <i>Características físicas</i> | 35 |
| 4.2 <i>Tratamiento de aguas residuales</i> | 36 |
| 4.2.1 <i>Tren de tratamiento de aguas residuales</i> | 37 |
| 4.3 <i>Sistema de biodisco</i> | 40 |
| 4.3.1 <i>Descripción</i> | 41 |
| 4.3.2 <i>Factores que afectan la operación de biodiscos</i> | 44 |
| 4.3.3 <i>Tipos de biodiscos</i> | 48 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 4.3.4 | Ventajas y desventajas | 49 |
| 5 | BIOPELÍCULA Y ECOLOGÍA DE POBLACIONES | 51 |
| 5.1 | <i>Clasificación de los seres vivos</i> | |
| | <i>Una visión panorámica</i> | 52 |
| 5.2 | <i>Bacterias</i> | 55 |
| 5.3 | <i>Biopelícula</i> | 57 |
| 5.3.1 | Formación de la biopelícula | 58 |
| 5.3.2 | Parámetros que Influyen en el desarrollo de la biopelícula | 61 |
| 5.4 | <i>Ecología de poblaciones</i> | 64 |
| 5.4.1 | Relaciones biológicas | 65 |
| 5.4.2 | Estratificación de poblaciones a nivel biopelícula | 68 |
| 5.5 | <i>Biodisco y biopelícula</i> | 73 |
| 6 | CINÉTICA DE BIOPELÍCULA | 78 |
| 6.1 | <i>Enzimas</i> | 79 |
| 6.2 | <i>Cinética enzimática y metabolismo</i> | 80 |
| 6.2.1 | Reacciones involucradas | 81 |
| 6.2.2 | Orden de la reacción | 82 |
| 6.2.3 | Análisis cinético Henri, Michaelis y Menten | 84 |
| 6.3 | <i>Metabolismo</i> | 86 |
| 6.3.1 | Cinética de crecimiento | 88 |
| 6.3.2 | Cinética de degradación de contaminantes | 90 |
| 6.4 | <i>Respirometría</i> | 92 |
| 6.4.1 | Poblaciones y respiración | 92 |
| 6.4.2 | Sistema de experimentación, Respirómetro de Warburg | 94 |
| 7 | METODOLOGÍA | 99 |
| 7.1 | <i>Materiales de estudio</i> | 100 |
| 7.2 | <i>Generación de la biopelícula</i> | 102 |
| 7.3 | <i>Diseño del experimento</i> | 104 |
| 7.4 | <i>Obtención de los valores de la respiración</i> | 107 |
| 7.5 | <i>Análisis de tendencia matemática</i> | 108 |
| 7.6 | <i>Método de Lineweaver y Burk</i> | 111 |

| | | |
|-----------|---|------------|
| 8 | RESULTADOS | 113 |
| 8.1 | <i>Resultados experimentales</i> | 113 |
| 8.2 | <i>Graficación de los resultados experimentales</i> | 114 |
| 8.3 | <i>Análisis de ajuste matemático</i> | 115 |
| 8.3.1 | Ajuste polinomial por mínimos cuadrados | 116 |
| 8.4 | <i>Cinética de degradación</i> | 118 |
| 8.4.1 | Tendencia cinética | 118 |
| 8.5 | <i>Inhibición enzimática</i> | 121 |
| 8.5.1 | Tipos de inhibición enzimática | 121 |
| 8.5.2 | Determinación del tipo de inhibición | 124 |
| 8.5.3 | Constantes cinéticas | 128 |
| 8.6 | <i>Mecanismos de acción y biopelícula</i> | 131 |
| | | |
| 9 | CONCLUSIONES | 136 |
| 10 | LITERATURA CITADA | 139 |
| | APÉNDICE | |

1 INTRODUCCIÓN

Actualmente en todo el mundo, se ingieren con regularidad pequeñas cantidades de sustancias tóxicas.

De tal manera, el hombre ha ido contaminando la atmósfera, hidrósfera y biósfera, a tal grado que ha ido permitiendo que numerosos biocidas contaminen a grados alarmantes, ya sea de forma latente, temporal, o en el peor de los casos de manera permanente.

En su búsqueda por la salud y el confort se han ido produciendo año con año centenares de drogas y sustancias, las cuales con el tiempo han mostrado ser tóxicas para los seres humanos lo cual no se sospechaba al inicio de su producción.

En la actualidad se acostumbra escuchar sobre problemas de contaminación atmosférica, sin embargo, la contaminación del agua probablemente afecta a tanta gente como la contaminación del aire; ya que desde un principio el hombre ha ido descargando sus desperdicios en las corrientes de agua que estaban (y están) a su alcance.

A pesar de ello, los residuos, se descomponen con bastante rapidez y los gérmenes se pueden eliminar mediante tratamiento químico.

En Cincinnati (1960) se contabilizaron las sustancias químicas identificables en las aguas de E.U. llegando a la cifra de 100 sustancias, de las cuales predominaron: detergentes, insecticidas, herbicidas, disolventes, etcétera (Dubos, R. y Maya, P., 1974).

Los adelantos científicos y tecnológicos han creado necesidades en la sociedad en su afán de conservar la salud. De esta manera las condiciones de higiene hacen de los productos de limpieza elementos de prioridad; así tenemos que en México durante 1974, se calculó una producción de más de 600 toneladas de productos que contienen al menos un detergente. Poco más de la mitad de esta producción se refiere a polvos para lavar, los demás incluyen jabones para tocador, polvos limpiadores, blanqueadores, detergentes líquidos, dentífricos, etcétera (García, M., 1990).

Si se considera el lavado comercial, doméstico, en seco, lavado de platos, metales, etcétera se puede decir que realmente el proceso de detergencia es muy importante en la vida cotidiana.

El aumento en la población ha traído como consecuencia que se consuma más agua y detergente que en los tiempos en que se utilizaba el jabón. El aumento poblacional implica un aumento continuo en el consumo de detergentes.

1.1 Problemática

La problemática de las aguas residuales es cada vez más actual conforme la densidad de población se incrementa. Los tensoactivos constituyen un

factor muy pequeño dentro del contexto poblacional, siendo potencialmente corregible en esta fuente.

Si se considera el constante aumento poblacional de la Ciudad de México, se observa una mayor demanda de agua y de inversiones, lo que hace más atractivo el reuso de agua, promoviendo también su uso para la industria.

En 1989 México, D.F., contaba con 9 plantas de tratamiento secundario biológico de lodos activados con una capacidad instalada de 4.3 m³/s de aguas residuales que producen en promedio un caudal de 2.3 m³/s (DGCOH., 1989).

En 1991, en México, el caudal de aguas residuales de origen municipal totalizaba alrededor de 120 m³/s. Hasta julio del mismo año, se tenían registradas 604 plantas de tratamiento cuya capacidad instalada sumaba 23.5 m³/s y de las cuales solamente operaba el 59 por ciento. Desde entonces, la capacidad instalada se ha incrementado. El inventario actualizado hasta agosto de 1994 registraba 818 plantas de tratamiento, con una capacidad instalada total de 37.98 m³/s, equivalente a cerca del 32 por ciento del caudal total de aguas residuales de origen municipal. Al verificar el funcionamiento de las plantas de tratamiento se encontró que sólo el 74 por ciento de ellas operaba, con lo cual el caudal de tratamiento efectivo se reducía a 21.88 m³/s; es decir, el 58 por ciento de la capacidad instalada total (CNA., 1994).

El estudio sobre la degradación biológica de los tensoactivos se torna de gran interés en los años cincuentas a consecuencia de la revolución química; al mismo tiempo se comienza a reemplazar los jabones y fórmulas para lavandería por tensoactivos sintéticos que gracias al avance tecnológico se convierten técnica y económicamente más factibles.

Se crean objetivos de sanidad, siendo el objetivo del uso de los detergentes, remover y eliminar la mugre del objeto o superficie de interés.

Ya que la mugre ha sido definida como *materia ubicada en un lugar equivocado*, Se puede considerar que la piel humana es la fuente de mucha

materia sólida encontrada en el lavado. Estos sólidos son proteínas como fragmentos de piel, secreciones lípidas por las glándulas sebáceas, liberadas por el rompimiento de las células de la piel y residuos de la transpiración de las glándulas sudoríparas. Además, partículas sólidas del ambiente, residuos de comida y materiales de cosméticos y fármacos (Cutler, W.G. y Davis, R.C., 1972).

La incorporación de los detergentes sintéticos en productos de uso doméstico e industrial ha dado lugar a problemas como formación de espuma en lugares inconvenientes, cambios en el olor y sabor del agua, efectos nocivos en la flora y fauna acuática, inhibición en la germinación de semillas y otros (Carbajal, P., 1970).

Hace algunos años el agente tensoactivo comúnmente utilizado era la sal de sodio del alquil bencen sulfonato (ABS), que se deriva del alquil benceno, cuya cadena lateral es un tetrapropileno. Esta sustancia no es removida completamente por los procesos usuales de tratamiento de aguas residuales y no es degradado totalmente por el proceso de rompimiento natural oxidativo de las bacterias en las aguas de los ríos, provocando formación de espuma principalmente en cascadas y aguas con turbulencia. Otras sustancias orgánicas proteicas también presentan un efecto de disminución en la tensión superficial. Por ésto, aunque el ABS es un contribuyente significativo en la formación de espuma, en realidad no es el único.

Además de los problemas presentes en las aguas superficiales, existen problemas en las aguas subterráneas. La experiencia ha demostrado que cuando se descarga en un suelo arenoso, el ABS y otros contaminantes, pueden filtrarse a los mantos de agua.

Resumiendo, se puede decir que el problema de los tensoactivos residuales se puede dividir en tres áreas: el de tratamiento de aguas residuales, aguas superficiales y aguas subterráneas

A pesar de las grandes ventajas de estos productos, hay cierta desconfianza entre algunos operadores de plantas de tratamiento quienes piensan que las propiedades físicas de los tensoactivos pueden sacar de

operación a la planta. Estos temores nunca se han materializado con cierta significancia gracias a la eficiente técnica en el desarrollo de implementos para estos procesos y el encontrar nuevas condiciones de operación.

El ABS siempre va acompañado de otros contaminantes de origen doméstico o industrial por lo que el olor y el sabor que llegan a encontrarse debe ser más bien atribuido a la totalidad de los contaminantes.

Las aguas que son tratadas en las Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales llegan a presentar niveles de concentración de ABS que no llegan normalmente a valores que puedan ser apreciablemente peligrosos para la vida acuática o la germinación de semillas pero que permanecen en los sistemas acuáticos durante años pudiéndose acumular hasta causar daños.

Los tensoactivos artificiales se hacen notables en las aguas residuales tratadas y recicladas por la misma propiedad física que es la de retener sus propiedades espumantes a concentraciones por debajo de una parte por millón (ppm). La presencia de ABS puede ser verificado fácilmente por métodos simples y extremadamente sensitivos capaces de detectar unas cuantas partes por millón o menos (Swisher, R.D., 1987).

El contacto entre los detergentes y las proteínas es extremadamente frecuente. Dicho contacto puede ocurrir tanto con los productos del mercado por sí mismos o indirectamente por contacto con los componentes presentes en las aguas residuales y estos a su vez entran en contacto con organismos acuáticos y en consecuencia con mamíferos superiores. Los efectos de tensoactivos en humanos son de especial interés, principalmente para la industria farmacéutica y de cosméticos (Gloxhuber, Ch. y Künstler, K., 1992).

1.2 Efectos de los tensoactivos en el hombre

Poco después fue reconocido el problema de que el tensoactivo residual provenía del uso general del ABS, que como ya se ha mencionado se deriva del tetrapropileno, el cual contiene algunos componentes resistentes al

ataque microbiano. Una solución al problema, fue acordar el desarrollo de otros tensoactivos que puedan ser degradados por microorganismos. Dicho tensoactivo fue el alquil bencen sulfonato lineal (LAS) el cual tiene una funcionalidad superior y es económicamente más atractivo sobre los otros tensoactivos.

Dado el frecuente uso de tensoactivos en sus más variadas presentaciones se inician las investigaciones sobre efectos en el hombre y se ha observado que los tensoactivos no son tóxicos para los seres humanos.

Las concentraciones normalmente encontradas en los suministros de agua pública como resultado del reuso del agua residual son muy bajos, y por acuerdo general su presencia en el agua potable no es deseada, desde el punto de vista estético. Es así que los estándares del agua potable fueron revisados encontrándose en el U.S. Public Health Service (1962) el límite máximo permisible de 0.5 ppm de ABS sin registrarse el grado de formación de espuma con respecto a la concentración. De acuerdo con Wells (citado en Swisher, R.D., 1987) en 1978 este mismo nivel máximo permisible se registró en Rusia en 1970 y Sudáfrica en 1971; en cambio para la Organización Mundial de la Salud (OMS) tiene como límite 0.2 ppm. Ambas cifras son sugeridas en los E.U. 0.5 ppm para agua potable y 0.2 ppm para aguas naturales, basándose en estudios de toxicidad con organismos acuáticos.

El National Secondary Drinking Water Standards de la Agencia de Protección Ambiental (EPA) reconoció que dicho nivel fue establecido propiamente para la espuma más que para el ABS y que el límite máximo permisible de 0.5 ppm fue para los "agentes espumantes", aunque esto no sea lo más apropiado ya que dichos agentes espumantes dentro de las especificaciones son medidos por el viejo método analítico para la medición del ABS, la cual no detecta algunos agentes espumantes y no responde a algunas sustancias no espumantes (Swisher, R.D., 1987).

De los tensoactivos sintéticos encontrados en los productos modernos de limpieza y cosméticos, los tensoactivos aniónicos son los más comunes.

Con respecto a la protección ambiental, se consideran tres aspectos:

- 1 La característica que ha considerado como agente contaminante a los detergentes es su composición química que genera restos xenobióticos que permanecen en el medio y son potencialmente acumulables.**
- 2 Dentro de la protección ambiental, la salud humana es esencial. Por lo tanto, la seguridad toxicológica para los humanos tiene la más alta prioridad. El contacto con tensoactivos es cada vez más frecuente y menos evitable con el incremento de la población. Por lo tanto, es una obligación para la industria tener la evaluación toxicológica antes de sacar al mercado el tensoactivo.**

En este caso tanto el grado y los datos de toxicidad crónica son muy importantes. El grado de toxicidad es de gran interés en casos de ingestión, principalmente en los niños.

Otro aspecto relevante de la toxicología ambiental se refiere en cuanto a la toxicidad del tensoactivo encontrada en organismos acuáticos y el medio.

- 3 La característica menos deseable de los detergentes es la formación de espuma, la cual es sumamente ligera y fácil de ser transportada por el aire y las corrientes de agua, ésta puede transformarse en un vector de enfermedades.**

En cuanto a los efectos en humanos, se han reportado en publicaciones científicas (Matsumura. *et al.*, Neuman y Aalbers., Olson *et al.*, Oba *et al.*, Serrano *et al.*, todos citados en Gloxhuber., Ch y Kunstler, k., 1992), la relación entre la irritación inducida por los tensoactivos aniónicos y la inflamación de las membranas epidérmicas o colágeno. De tal manera que se han registrado altos niveles de inflamación con tensoactivos aniónicos mientras que para los tensoactivos catiónicos y noiónicos son muy pequeños. Los investigadores concuerdan que la inflamación registrada

para la epidermis es el resultado de un cambio conformacional reversible que coopera con el de los puentes hidrofóbicos de la molécula entre los residuos hidrofóbicos del tensoactivo y la proteína involucrada. No se ha observado ningún efecto en tensoactivos no iónicos. Por otro lado, el tensoactivo aniónico opera como un agente bifuncional, el cual explica este comportamiento (Tabla 1.1).

TABLA 1.1 Concentraciones utilizadas en Bioensayos con tejido ocular en ratas y ratones

| CONCENTRACIÓN | VÍA |
|-------------------------------------|-------------------------|
| mg/kg/d | |
| 0.0; 50.0; 100.0; 300.0 | Intragástrica |
| 0.0; 1.064; 10.64 | Intragástrica |
| 1 600.0 3 200.0 | Intragástrica |
| 0.0; 800.0 1 200.0; 1 500.0; 3000.0 | Intragástrica |
| % | |
| 15 | Epidérmica |
| 0.0; 15.0; 20.0 | Epidérmica |
| 0.0; 13.0; 17.0; 20.0; 25.0 | Epidérmica |
| 0.0; 13.0; 26.0 | Epidérmica |
| 0.0; 0.5; 5.0; 15.0 | Epidérmica |
| 13.0 | Epidérmica |
| 0.0; 5.0; 10.0; 20.0 | Epidérmica |
| mg/kg/d | |
| 0.0; 30.0; 150.0 | inyección intramuscular |
| 0.0; 5.0; 50.0; 500.0 | inyección intramuscular |
| 0.0; 0.8; 8.0; 1200.0; 2400.0 | inyección intramuscular |

La toxicidad crónica ha sido intensamente estudiada para diferentes especies animales; los resultados obtenidos durante dos años revelaron que no existe riesgo atribuible a dosis elevadas en condiciones usuales.

Posteriormente investigaciones a largo plazo en personas voluntarias no se observaron efectos serios y acumulación significativa de esta clase de compuestos en el organismo.

Basados en datos confiables y tomando en cuenta la cantidad posible de ingestión oral de tensoactivos aniónicos, pueden ser observados como no peligrosos para la salud humana cuando el uso es el común en los productos hogareños. Sin embargo, serios síntomas causados por los detergentes son reportados en la literatura, cuando son aspirados o ingeridos con intenciones suicidas:

- 1 En casos de ingestión de tensoactivos en solución se han reportado cambios en la permeabilidad de membranas del tracto digestivo. Se tiene suficiente evidencia a partir de los experimentos en animales que el grado de absorción por vía oral al tracto intestinal es menor que los efectos en los pulmones. En niños de meses de edad se han reportado que la ingestión (solución 0.5 % Sunil) provoca el deterioro general de la dermis que estuvo en contacto prolongado con el tensoactivo, sin llegar a perder el ritmo cardíaco normal; en cuanto al cuerpo se registraron edemas de baja gravedad.
- 2 En cuanto a inhalación sólo se ubicaron manchas edemáticas irregulares en los pulmones (Gloxhuber, Ch. y Künstler, K., 1992).

Generalmente los detergentes que se expenden en el mercado, cualquiera que sea su presentación, carecen de información completa al consumidor acerca de su toxicidad, precauciones de manejo y primeros auxilios en caso de accidente.

En el presente estudio se efectuó un censo en los principales centros de autoservicio de la zona metropolitana de la Ciudad de México, encontrándose 12 marcas predominantes en el mercado de las cuales ocho utilizan como tensoactivo al *alquil aril sulfonato de sodio* (AAS), ver Tablas 1.2 y 1.3

TABLA 1. 2 Principales marcas de detergentes consumidos en el área metropolitana, sus sustancias aditivas y el tansoactivo utilizado en su fabricación

| | | | |
|--|-----------------------------|---|---|
| Ariel con Blanqueador ULTRA | Procter & Gamble | Alquil aril sulfonato de sodio AAS | Carbonato de sodio Fosfato de sodio Perborato de sodio Enzimas Perfume |
| Fuerza Viva ULTRA | Colgate | AAS | Fosfato de sodio (ablandador) Agente quelante Protease Amilasa Abrillantadores Perfume |
| Bold 3 ULTRA Ablandador | Procter & Gamble | AAS | Fosfato de sodio Carbonato de sodio Perborato de sodio Bentonita (ag. suave) Qualante Enzimas |
| Ariel ULTRAMATIC | Procter & Gamble | AAS | Fosfato de sodio Sulfato de sodio (ad. proc.) Estabilizadores de espuma Ac. grasos saponificados Alcoholes etaxilatos Agentes biológicos |

TABLA 1. 2 Continuación

| | | | |
|------------------------------|-----------------------------|--|--|
| Roma Biodegradable | La Corona | Surfactante aniónico lineal | Fosfato de sodio Silicato de sodio Antiredepositante Blanqueadores ópticos Perfume |
| Foca | La Corona | Surfactante aniónico lineal | Enzima proteolítica Fosfato de sodio Silicato de sodio Ag. antiredepositante Blanqueadores Perfume |
| Rápido | Procter & Gamble | AAS | Fosfato de sodio Agentes Biológicos Perfume |
| Aurrerá (marca libre) | | Dodecil bencen sulfato de sodio | Tripolifosfato de sodio Silicato de sodio Carboximetilcelulosa Abrillantadores ópticos Perfume Enzimas Colorantes |

TABLA 1.3 Principales detergentes para trastes

| | | | |
|------------------|---|--|--|
| Paloma | Detergentes y Jabones Sasil, S.A. de C. V. | AAS | Sulfato de sodio Silicato de sodio Carboximetilcelulosa de sodio Abrillantadores ópticos Colorantes |
| Fibra Lux | Detergentes y Jabones Sasil, S.A. de C. V. | Dodecil bencen sulfato de sodio | Sulfato de sodio anhidro Silicato de sodio Trifosfato de sodio Toluen sulfonato de sodio Perfume Pigmentos |
| Salvo | Procter & Gamble | AAS | Sulfato de sodio Color |
| Axión | Colgate | AAS | Tripolifosfato pentasódico Sulfato de sodio Silicato de sodio Carbonato de sodio Ablandadores de agua Perfume Pigmentos Jugo de limón concentrado |

Ya se han mencionado los principales problemas de los detergentes que se encuentran en contacto con el ser humano, así como los fosfatos con el medio y la cadena alimenticia.

El agua potable es realmente la última vía en que se pudiera encontrar detergentes, la única vía de acceso es por contaminación con detergentes hogareños o por infiltraciones del sistema de aguas residuales.

La ingestión diaria de detergentes para un ser humano se estima entre 0.044 y 0.944 mg /kg (miligramo de tensoactivo aniónico por kilogramo de peso corporal), siendo un nivel alto solo para los niños. El nivel establecido para no causar efectos por tensoactivos aniónicos es de $200 \text{ mg kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$. Los estudios han mostrado que no hay ningún indicio de peligro más allá del margen de seguridad, que ya en si, es muy amplio.

A continuación se hará un pequeño resumen de los principales efectos de los tensoactivos en el ser humano.

Entre los efectos morfológicos de mayor trascendencia se encuentran las alteraciones genéticas.

Carcinogénesis

A los compuestos que propician o proporcionan las condiciones de crecimientos tumorales, se les llama oncogénico o tumorigénico, aquellas sustancias que pueden inducir el crecimiento de un tumor maligno se le llama carcinogénico.

La carcinogénesis inducida químicamente ha sido estudiada epidemiológicamente en personas que han sido expuestas ocasionalmente, por el ambiente o por medicamentos a un carcinógeno.

La influencia de los tensoactivos aniónicos en la solubilidad, dispersión, movilidad o penetración con otras sustancias de lavado, así como la relación con otros carcinogénicos potenciales que puedan ocasionar reacciones sinérgicas o antagónicas, han sido estudiadas.

También se han clasificado a los tensoactivos como agentes cocarcinogénicos, cuando no actúan como carcinogénico por sí solos, también tienen la habilidad de incrementar la incidencia tumoral cuando se encuentran con un carcinógeno, un ejemplo de esto es el dodecil sulfato de sodio donde se ha estudiado la acción aumentativa o depresiva en la tumorigénesis.

Mutagénesis

La mutación es un cambio en el contenido de la información genética la cual es propagada a las subsecuentes generaciones de células o individuos. Las mutaciones pueden ser generadas espontáneamente o pueden ser inducidas por una variedad de agentes físicos o químicos y pueden ocurrir tanto a nivel somático o de células germinales. Los tensoactivos aniónicos han ido desarrollando actividad mutagénica.

Teratogénesis

Se le llama teratogénesis a las posibles influencias adversas en el desarrollo del feto incluyendo efectos como letalidad, malformaciones y retardamiento en el crecimiento es decir efectos embriogénicos. Un teratógeno o agente teratogénico tiene una magnitud de efecto según la dosis y el tiempo de exposición en el feto. A la fecha, no se han registrado casos de teratogénesis en el hombre causados por detergentes.

Se han efectuado estudios de los tensoactivos aniónicos ABS y LAS en ratas, cuyos y conejos los resultados indicaron no peligrosidad para la teratogenicidad, ni tampoco efectos en el proceso reproductivo. En la tabla 3.1 se muestran algunos de los resultados experimentales en bioensayos con organismos vivos a diferentes concentraciones y en diferentes tejidos (Gloxhuber, Ch. y Künstler, K., 1992).

2 OBJETIVOS Y ALCANCES

El objetivo principal de este trabajo es determinar la cinética enzimática durante la degradación biológica de detergentes por biopelículas, comúnmente utilizadas para el tratamiento biológico de aguas residuales.

2.1 *Objetivos particulares*

- Determinar las constantes cinéticas de degradación de detergentes.
- Evaluar la eficiencia de remoción de detergentes en sistemas de biodisco.
- De acuerdo con los resultados obtenidos de las corridas experimentales, determinar la sensibilidad o efecto que tienen los

detergentes sobre la población bacteriana que compone la biopelícula.

2.2 Alcances

Para lograr los objetivos planteados se utilizará un respirómetro Warburg modificado para las determinaciones cinéticas, así como biopelículas generadas en la primera y tercera etapas del sistema de biodisco que se encuentra en la planta para tratamiento de aguas residuales de Ciudad Universitaria.

3 DETERGENTES EN AGUAS RESIDUALES

3.1 Historia

Desde 1935, aparecieron en el mercado mundial varios centenares de detergentes sintéticos comúnmente llamados *detsin* (en inglés *syndets*), agentes humectantes y agentes emulsivos.

En la búsqueda de algo funcional, se crean una gran diversidad de productos de limpieza; para 1945 una amplia variedad de detergentes sintéticos ya habían sido aceptados como sustitutos de los jabones, siendo su mayor ventaja que no precipitan a causa de los iones de la dureza del agua (Sawyer, C.N. y MacCarty, P.C., 1978).

En la antigüedad, el jabón era usado por los romanos, quienes descubrieron que la combinación de cenizas y grasas animales (batidos con barro

especial), sacaban la mugre de la ropa. Más tarde el jabón se hacía de la misma forma hirviendo barro y grasas al mismo tiempo.

Actualmente se elabora de la misma manera, hirviendo grasas animales o vegetales, como la palma, el coco y la soya con sosa cáustica. Los jabones se elaboran de productos degradables como aceites vegetales, mientras que los detergentes sintéticos provienen de productos no degradables derivados del petróleo (Lomelí, E., 1984a).

El desplazamiento del jabón por los detergentes sintéticos puede atribuirse principalmente a dos factores:

Primero.-Los jabones son insolubles en aguas duras, lo que dificulta la remoción de los sólidos. Los detergentes remueven ya sea sólidos en forma soluble por secuestro o sólidos en forma insoluble por precipitación.

Segundo.-Los nuevos productos no son solamente superiores en este aspecto sino también son mucho más baratos.

Como una consecuencia de la revolución química ocurrida en la industria de lavandería durante los años cincuenta, así como el paulatino desplazamiento de los jabones de pasta por los detergentes en polvo, hizo que la investigación en degradación biológica de detergentes asumiera mayor importancia. Este desplazamiento ocasionado por los detergentes trajo el desarrollo técnico y económico de los alquilbencen sulfonatos (ABS). El uso de detergentes se estableció en Estados Unidos y de ahí se desplazó a todo el mundo. En pocos años el cambio fue completo, siendo el ABS el detergente de mayor uso en el mundo (Swisher, R.D., 1987).

3.2 Clasificación

El valor principal del jabón ordinario es que elimina mecánicamente los microorganismos y sustancias ajenas, al reducir la tensión superficial y formar una emulsión (Lomelí, E., 1984 b). El proceso fisicoquímico de los detergentes es facilitar la adherencia del agua (humedeciendo o mojando),

desalojando la mugre y conservándola en suspensión en el agua, evitando que se vuelva a adherir a los objetos.

Los productos del mercado contienen otros elementos además del detergente, tales como: blanqueadores, perfumes, estabilizadores de la espuma, abrillantadores, fluorescentes, agentes antidepósito (sustancias químicas que evitan que el polvo no se apelmace dentro del paquete), colorantes, fosfatos, etcétera. Las funciones dadas por estos constituyentes son mantenidas generalmente por la alcalinidad de la solución de lavado.

Los detergentes se pueden clasificar según sus características por estructura química, propiedades fisicoquímicas, componentes de fabricación, formas de sustitución, usos, suplentes y otras propiedades específicas que depende del consumidor. Por ejemplo según su composición química en jabonosos, sintéticos, alcalinos; o por su estado físico: líquido, polvo, barras, etcétera (Guía del Consumidor, 1976).

En este trabajo se presenta la clasificación basada en las características fisicoquímicas generales que divide a los detergentes en: *aniónicos, no-iónicos, catiónicos, anfóteros y switteriónicos* (Sawyer, C.N. y MacCarty, P.C., 1978), (Cain, R. B., 1994). los cuales se tratarán más detalladamente en el capítulo de estructuras.

A continuación se da una breve explicación de la composición general de un detergente comercial y las características fisicoquímicas en que se fundamenta esta clasificación.

3.2.1 Composición y características físico-químicas

La composición de los detergentes comerciales consta de un 20 a 30 por ciento como máximo de detergente sintético. Contienen auxiliares de origen mineral que aportan propiedades deterativas suplementarias, tales como los polifosfatos y los carbonatos de sodio. De ellos se puede mencionar el silicato de sodio, el cual, además de evitar la corrosión, permite conservar al detergente bajo una forma pulverulenta. Gracias al oxígeno que se libera a partir de los 60°C, el perborato de sodio se comporta como un agente

blanqueador químico. Para estabilizar y acelerar la liberación de oxígeno también se utiliza silicato de magnesio.

Los detergentes comerciales contienen, además, aditivos diversos: Para obtener el *azul* se utilizan derivados del estilbena bajo el nombre de azuladores o agentes blanqueadores ópticos, los cuales absorben los rayos ultravioletas y reflejan la parte visible. El fenómeno de la fluorescencia aumenta, la blancura.

Entre los aditivos se puede mencionar a la carboximetilcelulosa que es muy utilizada e impide que la mugre se deposite sobre la ropa. O bien a los estabilizadores de espuma, que constituyen una de las características más problemáticas en las plantas de tratamiento.

En los últimos años se han venido ofreciendo detergentes "biológicos" que eliminan manchas, en su mayoría de alimentos. Esto no es más que enzimas, en su mayoría, proteolíticas, las cuales son muy eficientes a temperaturas bajas (0 a 100°C), éste ocurre aproximadamente a 48 °C y bajo cierto pH lo que le otorga al detergente la presentación deseada (Gloxhuber, Ch. y Künstler, K., 1992).

Otro concepto, por el cual se clasifican los detergentes es la biodegradación, se conoce como *Biodegradables* a los productos que provienen de cadenas lineales y *no biodegradables* si provienen de hidrocarburos de cadenas ramificadas o de hidrocarburos aromáticos. Un detergente completamente biodegradable es aquel que puede romperse por completo en los drenajes y convertirse en productos que no dañen el ambiente (Guía del Consumidor, 1975)

3.3 Estructuras

Las propiedades de limpieza, humedad y emulsificación se derivan de la naturaleza anfófila de la molécula del tensoactivo. Una molécula anfófila contiene dos estructuras químicas: la hidrofílica y la hidrofóbica, lo cual origina que la molécula en solución actúe sobre la interfase agua-aire

o agua-interfase-no-acuosa reduciendo la tensión superficial de la fase acuosa.

La estructura hidrofílica es soluble y su solubilidad depende de los grupos carboxilo, sulfatos, hidroxilos, o sulfonatos. La estructura hidrofóbica o parte insoluble o soluble en aceites, lo forma una larga cadena de hidrocarburos la cual varía de acuerdo al número de carbonos utilizado en el radical.

Parte soluble en aceites

Grupo orgánico

Parte soluble en agua

-COO-Na⁺

-SO₄-Na⁺

-SO₃-Na⁺

-OH

Figura 3.1 Estructuras que forman una molécula de detergente

Una simple definición del proceso del lavado consiste en la remoción de sólidos (sacar la materia de un lugar) a partir de un sustrato inmerso en algún medio, generalmente por la aplicación de una fuerza mecánica, en presencia de una sustancia química la cual disminuye en gran cantidad la adhesión de los sólidos al sustrato. El proceso es completo cuando los sólidos son mantenidos en suspensión y de esta manera pueden ser removidos durante el enjuagado, donde los tensoactivos juegan el papel principal.

La palabra tensoactivo ha sido falsamente utilizada para describir toda clase de agentes humedecedores, agentes emulsificantes y detergentes; siendo la la palabra tensoactivo, el nombre del componente básico o *activo* de una formulación detergente y cuya función es disminuir la tensión superficial e interfacial haciendo más fácil la acción humectante.

Los tensoactivos se clasifican químicamente en:

aniónicos

no iónicos

catiónicos
anfóliticos
zwitteriónicos

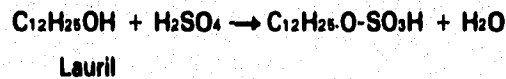
3.3.1 Tensioactivos aniónicos

Los tensioactivos aniónicos son aquellos que producen en solución acuosa iones cargados negativamente, el cual es el agente limpiador. Se originan a partir de los grupos sulfato o sulfonato. La parte hidrofóbica se encuentra ramificada, lo que disminuye marcadamente la biodegradación. Los más comúnmente utilizados son los *alquil aril sulfonatos* y los alcoholes grasos de sulfato.

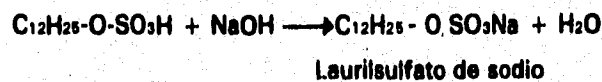
Los tensioactivos aniónicos son todas las sales de sodio y la forma ionizada que produzcan Na⁺ al ionizarse.

3.3.1.1 Sulfatados

Los tensioactivos aniónicos sulfatados son alcoholes de cadena larga que producen sulfatos (ésteres inorgánicos) con propiedades tensioactivas cuando son tratados por ácido sulfúrico. Los alcoholes dodecil o lauril son los más utilizados.



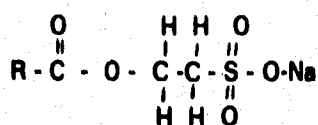
Posteriormente, los alcoholes sulfatados son neutralizados con hidróxido de sodio .



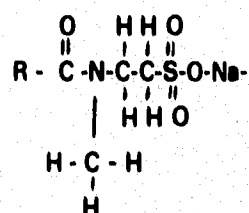
Los alcoholes sulfatados fueron los primeros tensioactivos producidos comercialmente. El alcohol sulfatado es usado en combinación con otros detergentes sintéticos para producir mezclas con propiedades selectas.

3.3.1.2 Sulfonatos

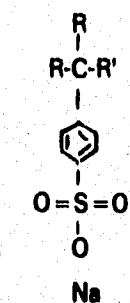
Los principales tensoactivos sulfonatos de importancia son los derivados de ésteres, amidas y alquilbencenos.



Ester



Amida



Secundario



Terciario

Alquil bencen sulfonato.

Figura 3.2 Tensoactivos sulfonatos derivados de ésteres, amidas y alquilbencenos

Los ésteres y las amidas utilizadas en la fabricación de agentes tensoactivos son ácidos orgánicos con 16 o 18 átomos de carbono. En el pasado los alquilbencen sulfonatos (ABS) fueron derivados de las largas cadenas de polímeros de propileno y del grupo alquilo con un promedio de 12 átomos de carbono altamente ramificados. Actualmente se elaboran de cadenas lineales como parafinas y de los alcanos, los cuales no son ramificados; el benceno está unido al carbono primario o secundario de la cadena. Estos últimos han sido mezclas denominadas LAS (alquil sulfonato lineal).

3.3.2 Tensoactivos no iónicos

Los agentes tensoactivos no iónicos son aquellos que contienen grupos hidrofílicos o hidrofóbicos que son orgánicos y no ionizables. La propiedad de la superficie activa aumenta a partir del efecto acumulativo que ejercen las fuerzas de atracción débiles de las estructuras hidrofílicas orgánicas. La molécula completa, actúa como un agente activo limpiador.

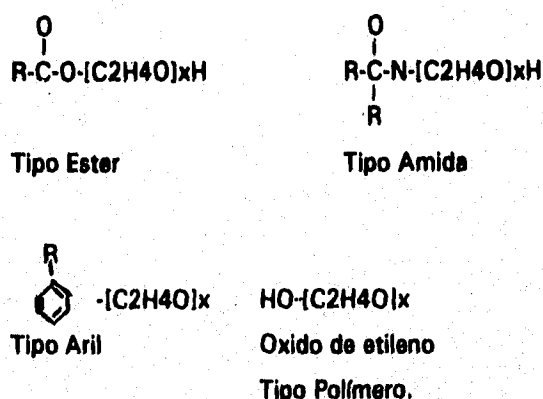
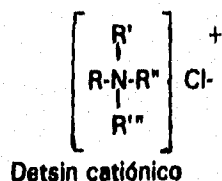


Figura 3.3 Tensoactivos no iónicos

Estos tensoactivos disminuyen el potencial espumante y su actividad no es afectada por el agua dura, esta última característica los hacen sumamente populares, aunque el costo de producción sea más elevado. Los tensoactivos no iónicos más comúnmente utilizados son los óxidos de etileno condensados de alquilfenoles y alcoholes grasos. Estos han tenido que depender de otros grupos en la molécula para poder ser solubles.

3.3.3 Tensoactivos catiónicos

Los detergentes sintéticos catiónicos son sales de hidróxido de amonio cuaternario o bien derivados del N-heterocíclico. En este proceso los hidrógenos del amonio han sido reemplazados por grupos alquilo.



Estos detergentes son populares por sus propiedades desinfectantes (bactericidas). Son usados en sanidad para el lavado de utensilios de cocina donde el agua caliente no es suficiente, así como para los objetos para niños donde la esterilidad es importante.

3.3.4 Tensoactivos anfóliticos

Tienen ambos centros positivos y negativos y pueden asumir la carga positiva o negativa dependiendo del pH de la solución. Ejemplos de estas clases son sodio-3-dodecil amino propionato y sodio-3-dodecil aminopropano sulfonato.

3.3.5 Tensoactivos zwitteriónicos

También tienen centros positivos y negativos los cuales son internamente balanceados, parecidos a los tensoactivos no iónicos. La molécula completa actúa como el agente activo limpiador; un ejemplo de esta clase es 3-(N, N-dimetil-N-hexadecilamonio)propano-1-sulfonato (Sawyer, C.N. y MacCarty, P.C., 1978).

3.4 *El problema de los fosfatos*

El polifosfato de sodio, puede constituir el 50 % de la composición total del detergente. Dada la importancia de este componente en la formulación de los detergentes, es necesario hacer una pequeña reseña del efecto indirecto que tienen estos sobre el ambiente. Los polifosfatos ayudan a disminuir la dureza de ciertas aguas, facilitan la emulsión de los aceites y de las grasas, y mantienen la mugre en suspensión. Al modificar la alcalinidad del medio favorecen la acción específica del detergente, sin embargo los fosfatos no se descomponen más que parcialmente en las instalaciones de depuración y la mayor parte de ellos sale intacta; este residuo constituye un nutriente en el agua ocasionando eutroficación en los medios acuáticos. Los fosfatos (por lo común tripolifosfatos de sodio, pirofosfato de sodio) contenidos en las aguas naturales provienen de diferentes fuentes como abonos químicos, desechos orgánicos y detergentes residuales. Estudios elaborados en E.U.

indican que aproximadamente un 30 por ciento de los fosfatos provienen de los detergentes

3.5 *Antecedentes en los procesos de degradación bacteriana*

Un detergente biodegradable es aquel cuya composición de cadenas abiertas, pueden romperse completamente en el drenaje y convertirse en productos que no dañan el ambiente. Su disolución tarda entre 15 y 19 días (García, M., 1990).

Los jabones comunes y los alcoholes sulfatados son utilizados como alimento por las bacterias. Los detergentes compuestos por esteres o ligamientos con amidas son fácilmente hidrolizadas. Los ácidos grasos constituyen una fuente de alimento para las bacterias dependiendo de la estructura química. Así se puede ver que los detergentes preparados a partir de polímeros de oxido de etileno parecen susceptibles al ataque bacteriano. Los alquil bencen sulfonatos derivados de propileno parecen resistentes al ataque bacteriano por que la cadena ramificada de los grupos alquilo y los anillos de benceno están adheridos principalmente en los átomos terciarios de carbono, por esta resistencia persisten después de un tratamiento normal biológico contaminado aguas superficiales y subterráneas con la propiedad espumante. La U.S. Public Health Service estableció el límite de 0.5 mg./l en aguas potables como estándar y así como el cambio en la producción de los detergentes industriales por LAS. El LAS es degradable en condiciones aerobias y su uso ha ayudado a resolver el más serio de los problemas, su característica espumante. Sin embargo, otros jabones comunes, son resistentes a la degradación bajo condiciones anaerobias (Sawyer, C. N. y MacCarty, P.C., 1978).

Los alquil bencen sulfonatos lineales (LAS) son los que tienen mayor demanda en el mercado; aproximadamente 1.8 millones de toneladas métricas de LAS son anualmente producidas en el mundo (Berth, P. y Jeschke, P., 1989).

El elevado consumo de detergentes, su disposición y su descarga en ríos y estuarios; hace necesario, realizar estudios de biodegradación.

Dentro de los análisis de degradación natural Okpokwasili, G.C. y Olisa, A. O. quienes en 1991 elaboraron pruebas tanto de detergentes líquidos como de shampoos, mediante el análisis llamado *river water*, el cual se fundamenta en la presumible biodegradación de la mayoría de los componentes químicos como resultado de la actividad biológica de la comunidad microbiana. En esta investigación los shampoos sufrieron una rápida biodegradación primaria más que los detergentes líquidos en un 97 por ciento al 59 por ciento, en un periodo de 12 días. Por otro lado, se pudo comprobar mediante cultivos microbianos enriquecidos con detergente, una disminución en el tamaño de la población más no la eliminación de la comunidad microbiana dependiendo de la marca de detergente utilizado (*e.i.* en el principio activo y la concentración), lo cual indicó que los detergentes o shampoos que soportan los mayores crecimientos microbianos no son necesariamente los más fácilmente degradados.

Otro de los estudios en corrientes, sobre degradación natural se realizó en el sur de Dakota (E.U.) en donde se observó un rápido decremento en la concentración de detergentes a una distancia de 90 Km corriente abajo. Este remoción se efectuó por biodegradación y por sedimentación de partículas (Rapaport, R.A. y Eckhoff, W.S., 1990).

El efecto que puede causar la concentración de detergentes en el medio natural en conjunto con los componentes naturales del medio acuático es la alta fuerza iónica del medio que provoca una caída en la concentración crítica micelar y consecuentemente la solubilidad es enormemente reducida, de tal manera, que algunos de estos materiales son acumulados dentro de los sedimentos provenientes de los desechos.

De igual manera se ha podido comprobar que la presencia de detergentes disminuyen la efectividad del barrido en las técnicas modernas de purificación de agua, facilitando nuevamente la contaminación bacteriana y viral de la misma (Ilin, I.E. 1985).

Hasta ahora se han contemplado los efectos dentro de la columna de agua, sin embargo, este conjunto representa un peligro obvio para las comunidades bentónicas, las cuales son de gran importancia en la cadena-alimenticia marina. Con respecto a esto se han efectuado bioensayos en moluscos, donde se observaron cambios en el comportamiento; no se asegura si la presencia del detergente biodegradable o no pueda ser la causa de tales cambios (Malagrino, W. *et al.*, 1987).

En monitoreos de aguas costeras en Alejandría se han encontrado valores que varían entre 0.02 mg de LAS /l y 12.55 mg de LAS /l, observándose que las sustancias activas superficiales modifican la estructura de las capas vecinas, afectando el proceso de transferencia de masa y energía a través de ellas. Los surfactantes naturales o sintéticos, cambian el estado soluble y fisico-químico de otros microconstituyentes en el agua marina e influyen su acumulación y difusión en las fases vecinas (Aboul-Kassim, T.A., 1992).

Ya que el problema tiene un origen antropogénico es necesario atacar el problema de origen, por lo que una de las medidas de mitigación a este problema es la planeación de procesos de tratamiento; se ha observado como el principal problema, desde el origen de la producción de detergentes, la formación de una espuma persistente y la lenta degradación de la molécula original de el alquil bencen sulfonato ramificado (ABS) un compuesto recalcitrante xenobiótico.

En 1963, dados los problemas de espumación se manufacturó el alquil bencen sulfonato lineal (LAS) cuya biodegradabilidad fué rápida y supuestamente lo suficientemente durable para que en el tratamiento de aguas residuales los problemas de espumado fueran eliminados.

Los trabajos fisico-químicos y de tratabilidad biológica de aguas de descarga industrial, doméstica y detergentes para alta dureza en polvo y líquidos, revelaron una alta contaminación en términos de DBO₅, DQO, surfactantes, fósforo, grasas y aceites, sólidos suspendidos y pH. El tratamiento biológico que se utilizó fueron unidades de lodos

activados. Los estudios de caracterización implican que la carga de contaminantes del efluente industrial puede decrecer primero por mecanismos físico-químicos, es entonces cuando puede ser tratado con unidades de lodos activados junto con las aguas domésticas. Mientras que los estudios a escala de laboratorio conducen a la obtención de parámetros de diseño del sistema de tratamiento (Çeçen, F., 1992).

Otro diseño para el tratamiento de los detergentes ya existentes, se planteó con estudios para ABS ramificado, en un tratamiento aeróbico, aclimatando a los microorganismos por un periodo de 15 días, encontrándose para un sistema de lodos activados una reducción de niveles de DBO, DQO y SAM de 80 por ciento, 68 por ciento y 69 por ciento respectivamente, estos bajos porcentajes de remoción tienden a indicar que se crea una acumulación de productos tóxicos finales, los cuales pueden ser la causa de la inhibición de productos finales o bien de la reversibilidad de la reacción química, (Hashim, M.A. y Kulandai, J., 1989).

Cuando la biodegradabilidad primaria, *e.i.* la desaparición de la molécula original, presenta tasas mayores del 95 por ciento en un sistema de tratamiento eficiente; se les ha tendido a llamar *detergentes verdes, detergentes ecológicos o biodegradables* (Pickup, J., 1990).

En un sistema de tratamiento de aguas residuales eficiente es muy importante que los ingredientes activos de los detergentes sean removidos durante el tratamiento de los desechos domésticos; para que posteriormente, los remanentes químicos de los efluentes tratados sean descargados en las aguas superficiales sean eliminados vía natural mediante los mecanismos de las corrientes. El grado y tasa de remoción dependen de las propiedades fisicoquímicas y ambientales, así como de la química de la molécula y sobre todo del tipo y eficiencia del proceso de tratamiento de las aguas residuales. Los alquilbencen sulfonatos que son algunos de los tensoactivos más frecuentemente utilizados en los detergentes, son típicamente removidos por más de 96 por ciento durante el tratamiento biológico secundario; cerca del 82

por ciento de este valor es dado por la degradación biológica, el 16 por ciento de la remoción es adsorvida por los sólidos y lodos de descarga. Las cantidades remanentes de los efluentes tratados pueden ser removidos por las aguas receptoras por biodegradación y adsorción de los sedimentos (Stalmans, M; Matthijs, E; y De Oude, N.T., 1991).

La producción comercial de LAS puede contener de 1 a 3 por ciento de LAB (alquil bencen lineal) el cual es unicamente biodegradado bajo condiciones aeróbicas. El rango de concentración de LAB va de 116 a 388 μg LAB /g de sólidos secos digeridos anaeróbicamente, en lodos activados fué significativamente baja en un rango de 58 a 78 $\mu\text{g/g}$. En la digestión anaeróbica de lodos se encontró una proporción de LAS:LAB entre 60:1 y 100:1 pero en lodos activados ésta fué de 1:1 (Holt, M.S. y Bernstein, S.L., 1992). Los datos publicados por Eganhouse *et al.* (1988) fueron concentraciones de 17 a 430 $\mu\text{g/g}$ siendo el valor más bajo para lodos activados y el más elevado para digestión anaeróbica. En 1987 Takada e Ishiwatari (1987) también reporta concentraciones similares de LAB 60.8 $\mu\text{g/g}$ para lodos activados; por otro lado los trabajos llevados a cabo por Crathorne *et al.* (1989) (citado en: Holt, M.S. y Bernstein, S.L., 1992) indican niveles 276 $\mu\text{g/g}$ para digestión anaeróbica para una planta de tratamiento de agua predominantemente de aguas domésticas y de 535 $\mu\text{g/g}$ para aguas de una planta de tratamiento de aguas industriales del Reino Unido.

En la planta de tratamiento de aguas residuales de Turin, Italia, el alquil bencen sulfonato lineal (LAS), tanto en los influentes como efluentes en fase líquida y fase sólida (columna de agua y lodos), se pudo observar una remoción de LAS del 90 por ciento y una biodegradación del 85 por ciento. Los productos comerciales de LAS son alquil bencen sulfonatos, mezclados con una fórmula rústica $\text{R-C}_6\text{H}_4\text{-SO}_3\text{Na}$, donde R consiste en una cadena lineal alquilo con átomos de C usualmente en el rango de C10 - C13. el LAS se biodegrada fácilmente y pierde sus propiedades tensoactivas rápidamente, al mismo tiempo que sus propiedades tóxicas y su familia molecular; en este estudio se pudo concluir que en la biodegradación primaria en las aguas residuales es

de por lo menos de 12 por ciento y la remoción total en las plantas de tratamiento es de 98 -99 por ciento; la biodegradación primaria de la planta es de un rango entre 80 - 84 por ciento (Romano. P y Ranzani M., 1992).

En Venecia se efectuaron monitoreos de actividad enzimática en los sedimentos, para la evaluación del potencial biodegradativo de la parte insoluble del sistema y la relativa importancia de las influencias antropogénicas. El estudio fué enfocado básicamente a tres enzimas insolubles (celulasa, fosfatasa y ureasa) numerosos sistemas de lavado se utilizaron para evaluar las fuerzas de atracción entre las enzimas y la fase sólida, la ureasa fué fuertemente ligada y no afectada por los métodos de lavado, mientras que la fosfatasa y parte de la celulasa pudieron ser removidos por los aniones de fosfato. La conformación de la celulasa también fué solubilizada por los detergentes no iónicos (Sabil, N., Cherqui, A., Tagliapietra, D y Coletti-Previero, M-A., 1994).

Todos estos estudios se han elaborado en busca de los límites de toxicidad, sin embargo a la fecha no se cuenta con una legislación que prevenga este problema, ya que se consideran poco dañinos, sin embargo se ha observado que el LAS es tóxico para la biota acuática, y el grado de toxicidad se localiza aproximadamente a 0.1 mg/l (Lewis, M.A., 1991).

En México se han efectuado pocas investigaciones sobre detergentes y su degradación en sistemas de tratamiento de aguas residuales. De estos trabajos, podemos mencionar a Möeller, G. y Fernández, G. quienes experimentaron con la adaptación de cepas bacterianas al ABS; también se encuentra el trabajo de Espinosa, R., *et. al* 1988 donde se destaca la influencia negativa de los tensoactivos en la degradación de detergentes por los microorganismos. Los trabajos posteriores solo registran estudios de impacto y difusión cultural sin hacer énfasis de toxicidad o daño.

Recientemente la investigación se ha encaminado a la biodegradación de detergentes de cadena lineal en varias especies bacterianas así

como en poblaciones puras, donde se ha reportado la clonación y secuenciación de los genes de degradación de dodecilsulfato de sodio (SDS) en *Pseudomona insueta* (Davison, J., et al. 1990 en Silver, S., et al. 1990); sin embargo, para la degradación de alquilsulfonatos de cadena ramificada solo existen reportes preeliminares a nivel bacteriano, en cuanto a sistemas de tratamiento solo se ha reportado, sobre la adsorción del detergente aniónico, SDS, a partir de soluciones acuosas en carbón activado como una alternativa para la eliminación de detergentes de agua dulce; en donde se analizaron parámetros como temperatura y pH, observándose un pH óptimo cercano a 7. La capacidad de adsorción se incrementa con el aumento de la temperatura la adsorción es irreversible y el calor de adsorción disminuye con respecto a la cantidad de detergentes adsorbido (Leyva, R., 1989).

Ahora bien, siendo la industria química la productora de estas sustancias surfactantes, es esta industria la obligada a mantener una mayor seguridad, a favor y mantenimiento del ambiente, sin que la calidad humana sea necesariamente afectada en el proceso.

4 BIODISCO

La pregunta acerca de los contaminantes y los límites tolerables para proteger el ambiente, precisan de una contestación específica en cada caso concreto. Lo cual requiere del análisis de las condiciones y necesidades locales, junto con la aplicación del conocimiento científico; la experiencia y las normas reguladoras de la calidad del agua existentes.

Hasta ahora se han mencionado algunas de las características e impactos que los detergentes causan al género humano; sin embargo, para comenzar a hablar de los procesos de tratamiento es necesario conocer la amplia variedad de aguas residuales que existen, y cómo de alguna manera éstas han demandado procesos de tratamiento para satisfacer sus necesidades de limpieza.

4.1 Aguas residuales

Haciendo una breve descripción de las aguas residuales y a partir de las fuentes de generación; las aguas residuales pueden definirse como *una combinación de líquidos y desechos arrastrados por el agua, procedentes de: residencias, edificios comerciales e institucionales, junto con las provenientes de la industria, además de las aguas que pueden agregarse de manera natural, como las aguas subterráneas, superficiales o de precipitación.*

4.1.1 Fuentes de generación

De acuerdo a lo mencionado anteriormente, se puede decir que según su procedencia se pueden clasificar de la siguiente manera:

Aguas residuales domésticas: son las que contienen desechos humanos, animales y domésticos, incluyéndose infiltraciones de aguas subterráneas; son típicas de zonas residenciales en la que no afectan operaciones industriales, o sólo en pequeña escala.

Aguas residuales sanitarias: son aquellas que además de incluir las aguas residuales domésticas se suman los desechos industriales de la población.

Aguas residuales pluviales: están formadas por los escurrimientos superficiales de las lluvias naturales, de la zona climática del terreno.

Aguas residuales combinadas: son la suma de las aguas domésticas, sanitarias y pluviales colectadas en la misma red de drenaje.

Aguas residuales industriales: son los desechos provenientes de los procesos industriales, las cuales idealmente deben de ser colectadas de manera aislada y no formar parte de las aguas residuales combinadas.

Definiendo por su aspecto físico, *las aguas residuales son líquidos turbios que contienen material sólido en suspensión.*

4.1.2 Características físicas

Cuando las aguas residuales son frescas, su color es gris y tienen un olor a moho no desagradable. Flotan en ellas materiales como: sustancias fecales, trozos de alimentos, basura, papel, astillas y otros residuos de las actividades cotidianas de los habitantes de una comunidad. Con el paso del tiempo, el color cambia gradualmente de gris a negro, desarrollándose un olor ofensivo y desagradable; y sólidos negros aparecen flotando en la superficie o en todo el líquido. En este caso se denominan aguas residuales sépticas (Departamento de Sanidad del Estado de Nueva York, 1990).

Debido a la gran cantidad de materia orgánica que poseen las aguas residuales, así como la gran cantidad de microorganismos patógenos provenientes del aparato digestivo, o que están presentes en ciertos residuos industriales, pueden producir grandes cantidades de gases malolientes, focos de infección, e incluso pueden llegar a causar eutroficación en los depósitos finales. Por estas razones, la eliminación inmediata y sin molestias del agua residual desde sus fuentes de generación, seguida de su tratamiento y evacuación no es solamente deseable sino que es necesaria (Metcalf y Eddy, 1985).

El proceso de biodisco es una opción para obtener agua reutilizable a partir de aguas residuales. Se puede emplear tanto para la eliminación de la demanda bioquímica de oxígeno (DBO) y del nitrógeno amoniacal como para la desnitrificación de aguas nitrificadas.

Como alternativas de tratamiento secundario, el uso de este proceso se ha incrementado considerablemente desde su aparición a nivel internacional en los años sesenta, debido a su efectividad y versatilidad para tratar aguas residuales. Sin embargo, en México dicho proceso es una tecnología prácticamente desconocida y además extranjera, que implica gastos de importación (González, S. y Castro, J., 1989).

4.2 Tratamiento de aguas residuales

Nuestro país cuenta con ciertos antecedentes históricos con respecto al tratamiento de aguas residuales, son conocidos los diseños de construcción para el desagüe de los grandes palacios y templos. En 1519, en *Las Cartas de Relación de Hernán Cortés* son notables las descripciones tanto de construcción como de organización social que se relatan, y mucho más las maravillas naturales desde su llegada a Cozumel. De la segunda carta se reproduce un fragmento *...tenía diez estanques de agua, donde tenían todos los linajes de aves de agua que en estas partes se hallan, que son muchos y diversos, todas domésticas; y para las aves que crían en el mar, eran los estanques de agua salada, y para las de los ríos, lagunas de agua dulce, la cual agua vaciaban de cierto a cierto tiempo, por la limpieza, y la tornaban a henchir por sus caños...*

El tratamiento sistemático de las aguas residuales surgió a finales del siglo pasado y principios del presente, aunque en nuestra cultura ya existían algunos antecedentes el desarrollo de los mismos se tornó más lento.

Retomando la historia europea, en Inglaterra, Sir Edwin Chadwick, abogado de profesión a quien le preocupaba las condiciones de vida de los pobres, hizo varias recomendaciones de mucho alcance, siendo su recomendación más revolucionaria la de un sistema de drenaje subterráneo para sacar los desperdicios de las casas.

Posterlormente, el descubrimiento en microbiología de Koch y Pasteur marca el inicio de una nueva etapa en el saneamiento; donde la bacteriología, se inicia aplicándose en el tratamiento de las aguas residuales.

A principios de este siglo los daños y las condiciones sanitarias trajeron consigo una creciente demanda en el mejoramiento del tratamiento de las aguas residuales. La falta de zonas suficientes para la evacuación en la tierra de agua residual no tratada, especialmente en grandes ciudades, condujo a la adopción de métodos de tratamiento más intensos.

Los objetivos que se podrían mencionar en el tratamiento de las aguas residuales, se enlistan a continuación:

- 1 Conservación de las fuentes de abastecimiento de agua para uso doméstico.
- 2 Prevención de enfermedades.
- 3 Prevención de molestias.
- 4 Mantenimiento del agua limpia para el baño y otros propósitos recreativos.
- 5 Mantener limpias las aguas para los seres vivos que habitan en ellas como su ambiente natural.
- 6 Conservación del agua para usos industriales y agrícolas.
- 7 Prevención de azolve de los canales de navegación.

En la actualidad, la red de drenaje profundo no se da abasto para cubrir las necesidades de la población cada vez más crecientes, y es común ver los encharcamientos, inundaciones y desastres causados por la mala planeación de este sistema durante la época de lluvias, así como los malos olores que despiden los drenajes superficiales que atraviesan la Ciudad. Se han invertido millones de pesos en las instalaciones para el tratamiento de aguas residuales, creándose nuevas e innovadoras plantas de tratamiento que aún no se ponen en práctica.

4.2.1 *Tren de tratamiento de aguas residuales*

Aunque son muchos los métodos usados para el tratamiento de las aguas residuales, todos pueden incluirse dentro de los cinco procesos siguientes:

- Tratamiento preliminar
- Tratamiento primario
- Tratamiento secundario
- Cloración
- Tratamiento de los lodos

Tratamiento preliminar

Su objetivo principal es la de proteger el equipo de bombeo y hacer más fáciles los siguientes procesos.

Tratamiento primario

En esta fase se separan o eliminan la mayoría de los sólidos en suspensión de las aguas residuales.

La actividad biológica en las aguas residuales, durante este proceso tiene gran importancia. Su propósito consiste en disminuir la velocidad de las aguas residuales para permitir la sedimentación de los sólidos por lo que se les puede llamar *sedimentadores*.

Tratamiento secundario

También llamado *proceso biológico*; en éste se llevan a cabo reacciones bioquímicas para eliminar las impurezas solubles o coloidales, normalmente sustancias orgánicas.

Dentro del tratamiento biológico y la enorme diversidad de microorganismos que intervienen en dicho proceso, se pueden dividir en *dos tipos*: los *procesos biológicos aerobios*, los cuales requieren de oxígeno molecular para llevar a cabo la descomposición y los *procesos biológicos anaerobios* los cuales pueden prescindir de él.

Los procesos biológicos aerobios incluyen filtrado biológico y los lodos activados. Los procesos de oxidación anaeróbica se utilizan generalmente para la estabilización de lodos orgánicos y desechos orgánicos de alta concentración (Tebbut, T., 1990).

Los dispositivos utilizados en el tratamiento secundario pueden dividirse en grupos tales como:

a) Proceso biológico aerobio

- Filtros rociadores
- Tanques de aireación
 - Lodos activados
 - Aireación por contacto
- Biodisco
- Filtros de arena intermitentes
- Tanques de estabilización

b) Proceso biológico anaerobio

- Sistemas de medio en movimiento
- Digestión anaerobia
- Procesos anaerobios de contacto
 - Sistemas de medio fijo
 - Filtro anaerobio
 - Estanques anaerobios

Desinfección

Sus propósitos más importantes son la desinfección, la prevención de la descomposición, siendo un auxiliar en la operación de la planta.

Tratamiento de lodos

Tiene dos objetivos:

- 1) Eliminar parcial o totalmente el agua que contienen lodos, para disminuir su volumen, y
- 2) Descomponer el total de los sólidos orgánicos putrescibles transformándose en sólidos orgánicos relativamente estables.

4.3 Sistema de biodisco

Dentro de los sistemas secundarios o biológicos de tratamiento de aguas residuales las investigaciones sobre técnicas alternativas de tratamiento, da como resultado sistemas de Película Biológica los cuales se dividen en:

- a) Sistemas de medio fijo.
- b) Sistemas de medios en movimiento, éstos a su vez se subdividen en:

- b.1. Contactadores biológicos rotativos o biodiscos**

- b.2 -Sistemas de lecho fluidizado**

El principal objetivo del sistema de *biodisco* o *contactador biológico rotatorio* es la eliminación del material orgánico disuelto que se encuentra en las aguas residuales. También pueden ser utilizados, de forma simultánea, para la oxidación del amoníaco que se encuentra en las aguas residuales o que se produce por actividad de los microorganismos presentes en el agua.

Su aplicación más común es en el tratamiento de aguas residuales de tipo doméstico y municipal. Se conocen múltiples casos de la utilización de biodisco en la industria (González, S., 1992).

El contactador biológico rotatorio para tratamiento de agua de desecho fué concebido y registrado originalmente por Weigand en Alemania, en 1900, en el cual se describe un cilindro constituido por tablas de madera. Se tienen registros que indican que los contactadores biológicos rotativos, que de aquí en adelante se denominará *biodiscos*, se han venido utilizando en el tratamiento de aguas residuales desde el inicio del siglo. Aunque el proceso es interesante la idea original fué registrada por A.T. Malby hasta 1928.

En EUA, J. Doman realiza la primera investigación sobre discos como medio de soporte; efectúa pruebas con discos metálicos rotatorios publicando los resultados en 1929, estos resultados no fueron alentadores y las investigaciones se abandonan. No fué hasta 1930 cuando Bach e Imhoff, utilizan dicho cilindro para mejorar la eficiencia de los tanques Emsher.

El desarrollo moderno de los biodiscos se inicia en Alemania en 1957 cuando la compañía J. Stengelin fabrica discos de 2 y 3 m de diámetro.

En 1960, se lleva a cabo la primera instalación comercial; experimentos posteriores confirmaron los resultados favorables de esas pruebas y el proceso fué denominado como *Rotating Biological Contactor* comenzando su comercialización masiva a principio de los 70's en Estados Unidos, por la empresa Allis-Chambers (Antonie, R., 1976) (González, S. y Castro, J., 1989).

Entre los principales fabricantes europeos de biodiscos se puede mencionar a más de 50 entre ellos Ames Crosta (fabricante de las *plantas paquete* de las cuales se hablará más adelante). Otra empresa europea que fabrica gran cantidad de biodiscos con diferentes características en Alemania es NSW (Norddeutsche Seekabelwerke) con biodiscos que van desde 2 a 4m de diámetro (González, S., 1992).

4.3.1 Descripción

El sistema de Biodisco se encuentran al igual que otros sistemas biológicos asociados a sedimentadores primario y secundario; por lo que el tren de tratamiento queda constituido por un sedimentador primario, biodisco y un sedimentador secundario, (ver Figura 4.1). Este tipo de tren de tratamiento los cuales se construyen en tanques de acero al carbón o de fibra de vidrio, dependiendo del tamaño y la resistencia estructural deseada, y cuyos discos de polietileno corrugado cuyo diámetro oscila entre 1.5 y 2.5 m, constituyen lo que se llama *planta paquete* el cual se ha popularizado mucho en el Reino Unido y cuya principal aplicación es para el tratamiento de aguas residuales de pequeños conjuntos habitacionales.

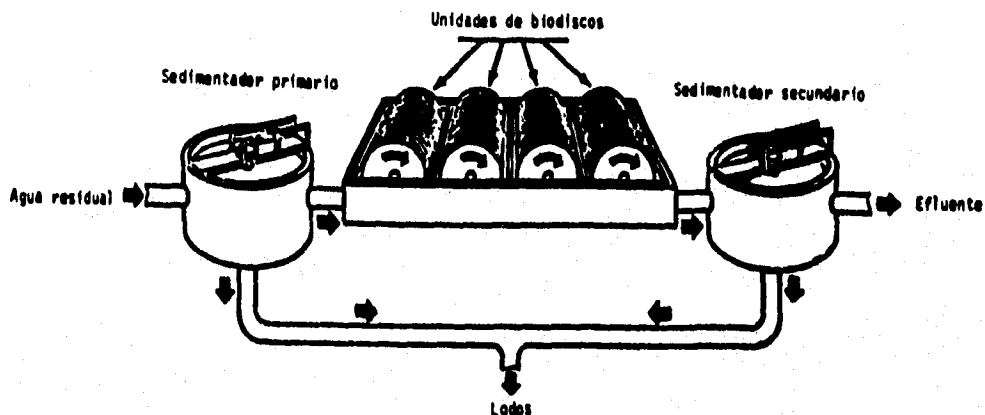


Figura 4.1. *Planta Paquete* utilizada para el tratamiento de aguas residuales (Autotrol, 1978)

El biodisco consiste en una serie de discos circulares, construidos en poliestireno o polietileno desplegado o corrugado, o bien de metal desplegado, de 10 a 20 mm. de espesor, y montados en el eje horizontal con un espaciamiento de 20 mm. entre los discos adyacentes (Metcalf y Eddy, 1985), (Winkler, M., 1986).

Originalmente los materiales de construcción para los discos que constituyen las unidades del biodisco originaban problemas mecánicos y de funcionamiento y no fué que con el advenimiento de los plásticos que se resolvieron los problemas de fallas en el eje y la transmisión (Winkler, M., 1986).

Los discos o material plástico cumplen con varios propósitos: son un soporte para las poblaciones, sirven como dispositivo de mezclado en el tanque y permiten la oxigenación del medio (González, S., 1992).

El medio de soporte se puede obtener con diversas configuraciones, como discos, construcción de retículas o un recipiente de rejilla de alambre con un medio de plástico aleatorio. La dimensión que generalmente poseen los discos es de 2 a 3 m de diámetro, fabricados de poliestireno o polietileno desplegado o corrugado. El medio gira a una velocidad de aproximadamente de 1 a 7 r.p.m.

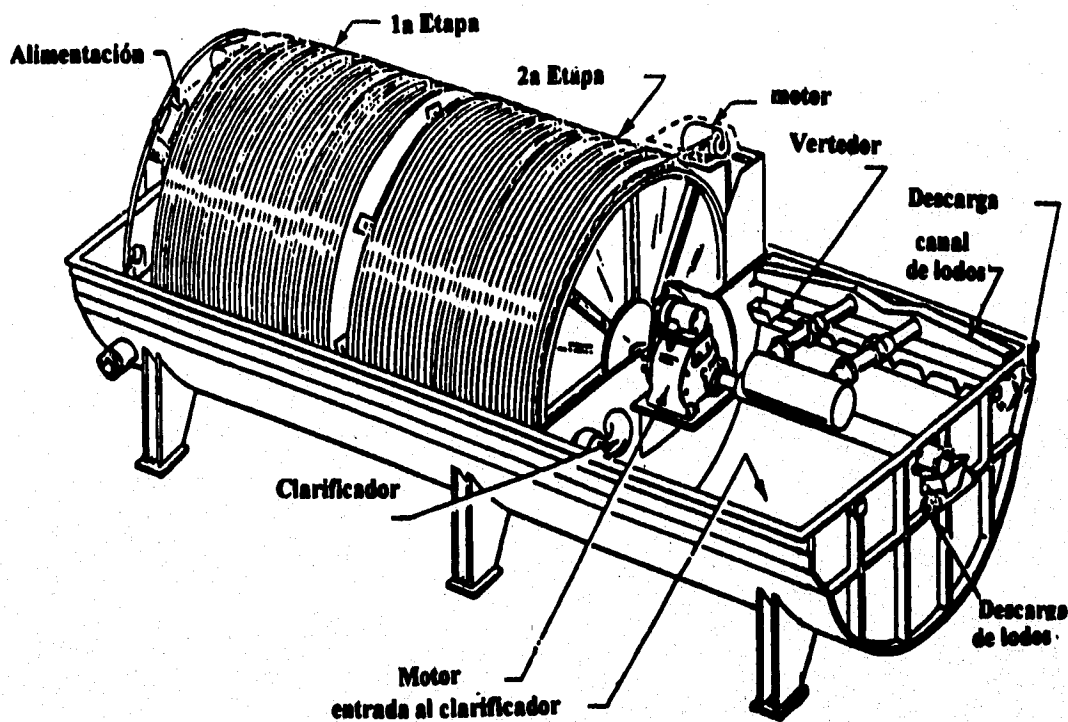


Figura 4.2 Corte transversal de una unidad de biodisco
Shigehisa, I. y Takane, K., 1994

El tiempo de retención del líquido es comparable al de un filtro percolador, aproximadamente 7 minutos para una etapa de 50 discos. Este efecto de intensificación es el resultado de la densidad de la biomasa que se puede mantener sobre la superficie del soporte.

4.3.2 Factores que afectan la operación del biodisco

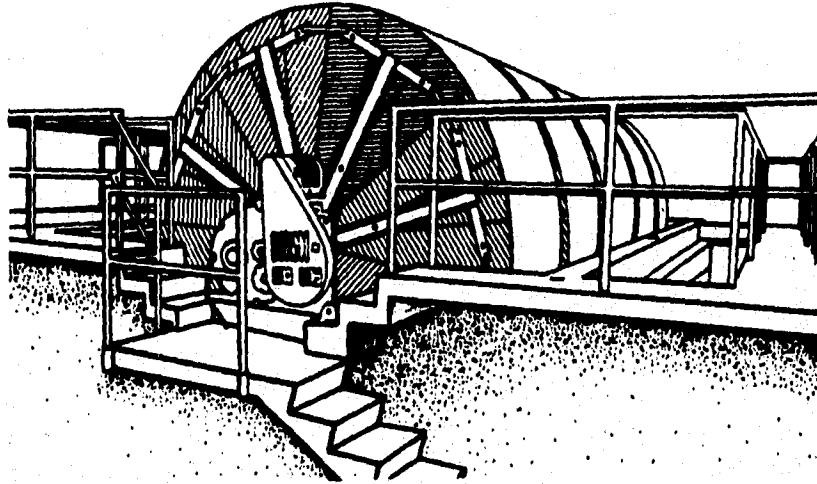


Figura 4.3 Vista frontal de una unidad de biodisco
Shigehisa, I. y Takane, K., 1994

Dado que el biodisco es un sistema de tratamiento el cual depende de factores físicos, químicos, biológicos y ambientales; para permitir el establecimiento y mantenimiento de la comunidad microbiana en las mejores condiciones, es necesario mencionar los factores más importantes que afectan de manera más sustancial el crecimiento y funcionalidad de la película microbiana.

Temperatura

Este es un factor indirecto ya que su variación afecta de manera directa parámetros como:

a) Oxígeno disuelto

La variación más importante radica en la solubilidad del oxígeno. Para el oxígeno atmosférico se tienen valores de saturación de 14.6 mg./l a 0°C, de 9.0 mg./l a 20°C y de 6.8 mg./l a 30°C en agua libre de cloruros a 1

bar (APHA, 1985). A más de 30°C, el valor disminuye hasta un punto en el cual la solubilidad casi desaparece.

b) Viscosidad del fluido

Al disminuir la temperatura la viscosidad del agua aumenta y se requiere más energía para mantener constante la velocidad de giro del biodisco.

En general, Autotrol (1978) señala que cuando el agua de desecho es tratada entre 12 y 32 °C, la operación se lleva a cabo en forma satisfactoria. Si la temperatura de proceso es menor de 12 °C la eficiencia del tratamiento decrecerá significativamente. A más de 32 °C, la población bacteriana cambia de mesófila a termófila, y este último tipo de bacterias es menos eficiente en la eliminación de contaminantes.

c) Reacciones bioquímicas

El efecto de la temperatura sobre la cinética de crecimiento, puede llegar a modificar la eficiencia del sistema.

d) Desprendimiento masivo de la biopelícula.

Panoy y Middlebrooks (1983) observaron que a bajas cargas orgánicas y 20 C° disminuye la cantidad de biomasa, debido a la escasez de nutrientes, lo cual origina condiciones de inestabilidad en la adherencia.

pH

Antonie (1976) informa que se obtiene una eficiencia óptima en el intervalo de pH entre 6.5 y 8.5. Friedman *et al.* (1979) informan que el comportamiento del pH en una unidad de biodiscos es satisfactoria. Si la temperatura de proceso es menor de 12 °C, la eficiencia se ve disminuida. En una unidad de biodisco se observan dos caídas del valor de pH: la primera se debe probablemente a la producción de ácidos orgánicos y dióxido de carbono en las etapas iniciales y la segunda es ocasionada por el proceso de nitrificación

Alcalinidad

La alcalinidad de las aguas de desecho funcionan como amortiguador de los cambios de pH en un biodisco.

Comúnmente, las aguas de desecho domésticas tienen una alcalinidad entre 150 y 200 mg./l (como CaCO₃): por tanto, su capacidad amortiguadora permite el desarrollo eficiente de los procesos de degradación y nitrificación.

Salinidad

La concentración de iones cloruro está relacionada inversamente con la DBO de las aguas tratadas: a mayores concentraciones de cloruros corresponden menores valores de DBO. Por lo tanto, se puede esperar que el sistema de biodiscos funcione satisfactoriamente con aguas de desecho salinas y produzca salidas con la calidad deseada en un proceso secundario.

Velocidad de rotación

Desde 1979, algunos investigadores encontraron que la rapidez de utilización del sustrato aumenta con la velocidad de rotación, ya que velocidades altas mejoran la transferencia de oxígeno. Los resultados de las investigaciones sugieren que, al aumentar la velocidad periférica, se incrementa el coeficiente de transferencia de oxígeno y aumenta proporcionalmente la eficiencia de eliminación.

En conclusión se observó que la concentración de oxígeno disuelto cambia a lo largo del reactor (en cada etapa) y depende de la velocidad periférica de rotación. Observándose que la eficiencia de eliminación de materia orgánica se incrementa al aumentar la velocidad periférica; el efecto es más notable cuando se dispone de cargas orgánicas y/o hidráulicas altas.

Número de etapas

Una característica importante del biodisco dividido en etapas es que permiten que la película biológica contenga en cada etapa diferentes tipos de población bacteriana especializada en la degradación del sustrato correspondiente.

La acción de dividir el proceso en etapas contribuye a mejorar el comportamiento hidráulico, puesto que se dispone de una serie de tanques perfectamente mezclados y la distribución del tiempo de residencia se aproxima al comportamiento tipo flujo-pistón.

Aunque la calidad del efluente sea superior si el número de etapas aumenta, el desarrollo de organismos depredadores que afectan la supervivencia de las poblaciones bacterianas hace que se considere seriamente la opción de dividir el proceso en más de cuatro etapas.

Recirculación del efluente

Es poco común hablar de recirculación en un biodisco (Poon *et al.* 1979) afirma que el principal efecto de la recirculación es la reducción de la carga orgánica en la primera etapa.

Sin embargo, para no sobrecargar hidráulicamente el biodisco, es necesario aumentar el área superficial, lo cual origina una reducción de la carga orgánica; al reducir la carga orgánica se incrementa la eficiencia.

La recirculación es útil cuando se presentan condiciones de sobrecarga orgánica con gastos bajos (concentraciones elevadas en el efluente) en un rango mayor de $20 \text{ g DBO/d}\cdot\text{m}^2$ no siendo necesaria la recirculación a cargas orgánicas inferiores a $12.2 \text{ g DBO/d}\cdot\text{m}^2$.

Oxigenación

El tener condiciones anaerobias es uno de los principales problemas relacionados con la operación de biodiscos, ya que al presentarse

anaerobiosis se origina la degradación de los polímeros que dan consistencia a la biopelícula, ocasionando un desprendimiento de la biomasa de la superficie del medio de soporte.

Existen dos alternativas para mejorar la transferencia de oxígeno en el biodisco una es reemplazar el aire por oxígeno puro en un sistema cerrado y la otra es presurizar el sistema utilizando oxígeno puro o aire.

Es recomendable utilizar oxígeno para cuando se tengan aguas de desechos con alto contenido de contaminantes, cargas orgánicas mayores de 24 gDBO/d·m² evitando anaerobiosis e incrementándose notablemente la eficiencia del proceso.

Carga hidráulica y carga orgánica

Inicialmente se utilizó la carga hidráulica como criterio fundamental de diseño.

Dupont y Mckinney (1980) mencionan que la carga orgánica superficial no solo determina el gradiente que provoca la difusión de sustrato en la biopelícula, sino también el tiempo de reacción, y sugieren utilizar dicha carga como criterio de diseño.

En general, las primeras etapas son las más afectadas, ya que al recibir cargas orgánicas altas, la población queda constituida por organismos heterótrofos y la nitrificación es nula.

4.3.3 Tipos de biodiscos

Durante casi 20 años, la configuración más utilizada (actualmente se denomina estándar) es la de unidades con diámetros de 3.6m (13 ft), longitudes de 8m (28 ft) y con área superficial entre 9,300 y 11 100 m² (100 000 y 120 000 ft²). Cuando las unidades de biodiscos tienen separaciones internas para ser divididos en etapas, se tiene una pérdida de área superficial, lo cual no sucede cuando las unidades son fabricadas sin divisiones. Dentro de los denominados *países en vías de desarrollo*, México

es el único que fabrica biodiscos con tecnología propia en la configuración *estándar*.

4.3.4 Ventajas y desventajas

Este proceso presenta una serie de ventajas como son: la capacidad de amortiguar cargas de choque, corto tiempo de retención, bajos requerimientos de energía, eliminación de la canalización a la que son susceptibles los percoladores convencionales, baja producción de lodos, y excelente control del proceso, su mantenimiento es mínimo y no requiere de personal especializado para su operación.

Dentro del diseño otra ventaja del sistema de biodisco, es su facilidad para diseñar unidades e ir aumentando de esta manera su capacidad a futuro.

Dentro del proceso, no necesita recirculación de lodos por lo tanto, existe un ahorro de sistemas de bombeo y tuberías.

Cook y Wu, 1979 determinan que el biodisco puede recobrar rápidamente su utilidad en los casos donde las cargas hidráulicas y/u orgánicas aumentan y/o disminuyen en forma súbita o varían de manera intermitente.

Utilizando un menor volumen, el biodisco puede tratar un caudal mayor en un tiempo equivalente (Benefield, L. y Randall, C., 1980).

El tamaño del sedimentador secundario debe de ser más pequeño para el proceso de biodisco ya que la carga de sólidos es menor.

No es susceptible de taponamiento por desarrollo excesivo de la película ya que no hay acumulación.

Carece de problemas de aerosol y ruido.

El problema de formación de espuma por tensoactivos es menor que en otros procesos.

Sin embargo, algunas de las desventajas recaen en que el costo de la inversión inicial la cual es elevada; además de que para efectuar la instalación, generalmente se requieren grandes grúas y personal especializado.

En cuanto al establecimiento de un modelo matemático, dado que el proceso involucra tres fases (sólido, líquido y gaseoso) no se ha podido desarrollar un modelo satisfactorio.

Dada su difusión el sistema se ha denominado de diversas maneras de las que se tiene: *discos biológicos rotatorios, superficies biológicas rotatorias, biodiscos, bio-discos, discos rotatorios biológicos, reactores biológicos rotatorios, filtros rotatorios y con marcas comerciales como BioDisc, BioSurf, Aerosurf, Surfact y BioSpiral* (González, S. y Castro, J., 1989).

En México, la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) utilizó el nombre **Biodisco** para hacer el registro de marca del proceso.

5 BIOPÉLÍCULA Y ECOLOGÍA DE POBLACIONES

La tecnología en película microbiana o biopelícula se ha desarrollado rápidamente en las últimas dos décadas. Particularmente, en los procesos de filtros sumergidos.

Las razones por las que se ha generado dicho avance, se debe al desarrollo de medios elaborados en polímeros y a la extensión de su aplicación en procesos anaerobios; además de la creciente demanda de avances para el tratamiento biológico, así como las atractivas ventajas de los procesos de biopelícula que se han desarrollado.

Los procesos de biopelícula en aguas residuales, son tratamientos biológicos que utilizan organismos microscópicos adheridos a una superficie sólida, la cual entra en contacto con el agua residual de manera continua o intermitente; formando una especie de superficie de contacto, la cual se

encarga de transformar la materia orgánica e inorgánica a formas menos nocivas, función más efectiva que la de un filtro convencional (Shigehisa, I. y Takane, K., 1994).

Dentro de los procesos biológicos de tratamiento secundario de aguas residuales, los filtros tienen la función de transformar los sólidos solubles y coloides orgánicos en sólidos sedimentables. Para que posteriormente, estos sólidos sean separados de las aguas residuales en un sedimentador. La conversión de los sólidos solubles y coloides orgánicos en sólidos sedimentables es un complicado proceso bioquímico, donde la biopelícula es responsable de la descomposición de la materia orgánica en las aguas residuales; la composición de la biopelícula dependerá de los patrones de usos de agua y al agua de lluvias que se suma al drenaje (WPCF, 1988).

5.1 *Clasificación de los seres vivos* ***Una visión panorámica***

Las aguas residuales contienen incontables organismos vivos, en su mayoría microscópicos. Estos microorganismos son la parte activa de la materia orgánica que se encuentra en las aguas residuales, y su efectividad en el proceso, incluyendo la degradación y descomposición, depende de su éxito como comunidad.

Puede decirse con razón, que son los trabajadores que emplea un operador de plantas de tratamiento de aguas residuales y que su eficiencia puede medirse por el conocimiento y atención, a los gustos y aversiones de los hábitos nutritivos y ambientales de estos microorganismos.

Para comenzar a hablar de la biopelícula es necesario hablar de las características generales, de los principales grupos microscópicos que contienen las aguas residuales.

Los microorganismos, seres vivos tan pequeños que no se pueden ver a simple vista, constituirán la parte central de nuestro estudio. A continuación se hará una breve descripción de los seres vivos, basándonos en la clasificación moderna de Haeckel (Alonso, M., 1982).

Los virus

Aunque por sus características especiales, es difícil ubicar a los virus dentro de cualquiera de los reinos mencionados, pues aún no se determina su origen. Tanto por su antigüedad como por su baja complejidad se les podría considerar como un grupo independiente que represente el límite entre la vida y la no vida.

Haciendo una breve descripción, los virus son agregados moleculares constituidos por ácidos nucleicos, DNA o RNA, en el centro y por una cápsula de proteínas. A esta cápsula se le conoce como cápside y está formada por una serie de unidades proteínicas llamadas capsómeros.

Reino Monera

Se distingue por incluir células procariontes. Su nivel de organización es celular o colonial. No tienen aparato de Golgi, mitocondrias ni cloroplastos. Se nutren por absorción, aunque los hay fotosintéticos, pero en este caso la clorofila no se encuentra en cloroplastos. De reproducción asexual, aunque llegan a presentar fenómenos de sexualidad. Comprende dos grupos de organismos, las bacterias (de las cuales se hablará profundamente más adelante) y las cianofitas o algas verde-azules.

Reino Protista

Incluye a organismos eucariontes es decir presentan núcleo bien definido cloroplastos, mitocondrias y aparato de Golgi. Su nivel de organización es celular. Su nutrición es básicamente fotosintética, aunque hay algunos que la presentan por absorción. La reproducción es asexual y ciertas especies muestran procesos de sexualidad.

El reino Protista se clasifica en cuatro grupos:

Euglenofitas

Crisofitas (marinas)

Pirrofitas (marinas)

Protozoarios

Reino Fungi o de los Hongos

Organismos pluricelulares con algunos representantes unicelulares, todos eucariontes. Su nivel de organización es con principios de tejidos, nutrición heterótrofa por absorción: los hay parásitos y saprófitos. Viven incluidos en el medio que les proporciona el alimento. Sus Ciclos de vida poseen fases asexuales y sexuales. La reproducción es por esporulación y presentan procesos de sexualidad.

Reino Plantas

Incluye organismos pluricelulares con células eucariontes, es decir con membrana nuclear, cloroplastos y mitocondrias. La forma de nutrición predominante es la fotosíntesis tienen una pared celular rígida y no tienen movimientos independientes. Su nivel de organización es de tejidos, órganos y sistemas. Presentan reproducción sexual.

Reino Animalia

Incluye organismos pluricelulares con células que carecen de cloroplastos, pigmentos fotosintéticos y pared celular, su nutrición es heterótrofa por ingestión. Los hay de vida libre así como sedentarios. Su nivel de organización va desde tejidos hasta complicados aparatos y sistemas. En cuanto a su reproducción en la mayor parte es sexual aunque algunos presentan procesos asexuales como la gemación.

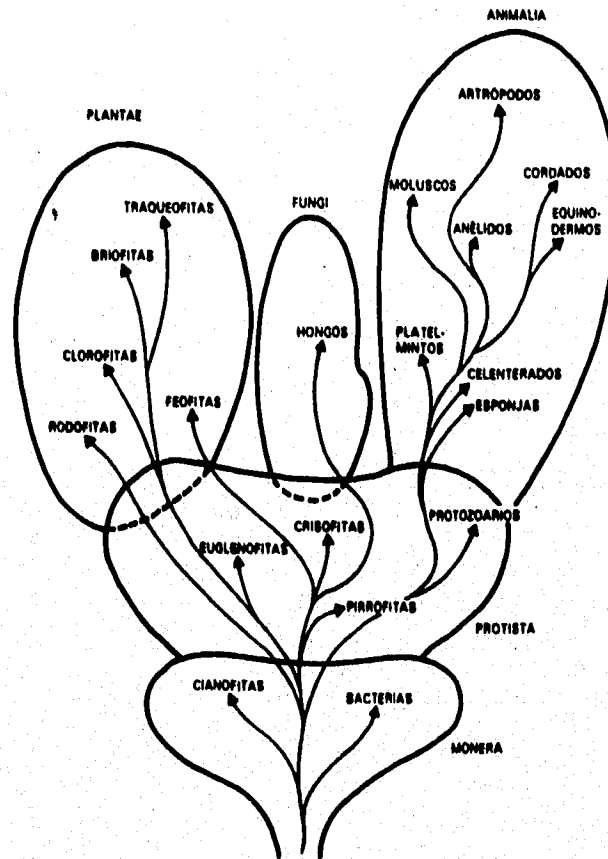


Figura 5.1 Arbol filigenético que considera los cinco reinos y establece sus relaciones evolutivas (Alonso, M., 1982).

5.2 Bacterias

Ya que las bacterias tienen la proporción más elevada de los microorganismos que constituyen la biopalcula y son la base de nuestro estudio se hará una breve descripción de las principales características de este grupo.

Las bacterias son organismos unicelulares cuyo tamaño va de una a tres micras. Son cosmopolitas. Aunque en general son células libres, algunas ocasiones forman conglomeraciones con cierto grado de complejidad.

La célula bacteriana se caracteriza por tener su membrana protegida por una pared celular compuesta químicamente por ácido diaminopimélico, sustancia exclusiva de las células del reino Monera.

Nutrición

Se tiene dos formas de nutrición, la ***autótrofa*** y la ***heterótrofa***.

Autótrofa. Es la nutrición en la cual el organismo por sí mismo sintetiza sus alimentos, lo cual puede ser por fotosíntesis o por quimiosíntesis, su diferencia estriba en el tipo de energía que utiliza.

En la quimiosíntesis aprovechan la energía química liberada en reacciones de oxidación de diferentes compuestos, siendo el CO₂ su única fuente de carbono por ejemplo. Algunas bacterias oxidan nitritos para producir nitratos y obtener energía para sintetizar sus alimentos. En cuanto a los fotoautótrofos, su energía la obtienen de los procesos de transformación de la energía lumínica, por fotosíntesis.

Heterótrofos, no pueden sintetizar sus alimentos, sino que los consumen ya elaborados. Hay que mencionar que muchos y posiblemente todos los heterótrofos consumen pequeñas cantidades de CO₂.

Estas son las dos formas básicas de nutrición, se puede tener una variedad de combinaciones en donde seguramente existe algún representante vivo, así se tiene a:

Los ***quimioautótrofos*** obligados, son específicos para sus fuentes de energía y utilizan uno o un pequeño grupo de compuestos relacionados, la mayoría de ellos son aerobios estrictos. Las bacterias ***quimioautótrofas*** pueden dividirse en base al elemento cuya oxidación las provee de energía para crecimiento y síntesis celular.

Respiración

molecular. Estos organismos se conocen como **bacterias aerobias**. y el proceso de degradación de sólidos orgánicos que se lleva a cabo se denomina **descomposición, degradación, u oxidación aerobia**. El cual se lleva a cabo en presencia de oxígeno disuelto, sin que produzcan olores ofensivos o condiciones desagradables.

Otro tipo de bacterias tienen que conseguir el oxígeno del contenido de oxígeno de los compuestos orgánicos y de algunos inorgánicos, el cual se hace aprovechable en la descomposición de los sólidos, a estos microorganismos se les conoce como **bacterias anaerobias**, y la degradación de sólidos se le conoce como **descomposición anaerobia**, la cual da origen a olores ofensivos y condiciones desagradables.

En las complicadas reacciones que se llevan a cabo en la degradación de los sólidos ciertos tipos aerobios y anaerobios se adaptan por sí mismos a vivir y funcionar en ausencia de oxígeno disuelto en el caso de las bacterias aerobias, o en presencia de oxígeno cuando se trata de bacterias anaerobias, a este tipo de bacterias adaptables se les conoce como **bacterias facultativas**.

Reproducción

Se reproducen asexualmente por bipartición, aunque existen algunas especies que realizan procesos de sexualidad (Cronquist, A. 1984).

5.3 Biopelícula

Como se puede ver en la Figura 5.1 la biopelícula que se forma en el sistema puede contener los más diversos componentes vivos, y se puede notar que cada uno de los cinco reinos y los virus incluyen algunos de sus representantes, constituyendo la más diversa comunidad de poblaciones.

La biopelícula se puede definir como: **una delgada capa compuesta de una numerosa y diversa población de organismos vivientes en la que se incluyen: bacterias, protozoarios, rotíferos, algas, hongos, gusanos y larvas de insectos.**

De tal manera los microorganismos que forman la biopelícula utilizan la materia orgánica del agua residual como su fuente de alimento y de oxígeno, además de aprovechar el oxígeno que circula a través del filtro del cual forman parte (WPCF, 1988).

5.3.1 Formación de la biopelícula

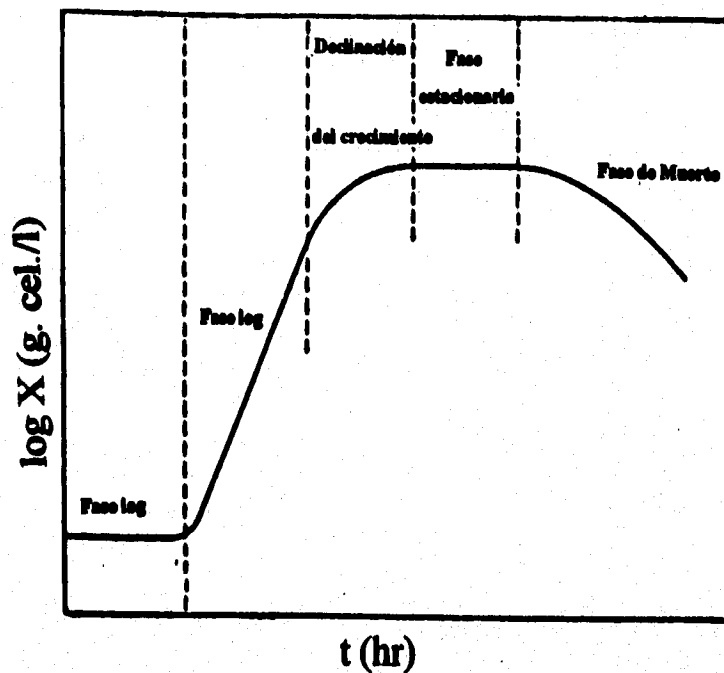
El asentamiento de una comunidad biológica en un hábitat determinado depende de las condiciones físicas, químicas y biológicas del medio.

De manera muy general, se puede definir que el proceso de formación de la biopelícula sobre una superficie se divide en tres fases: *Inducción, acumulación y estabilización.*

Inducción: Comprende la adsorción de los compuestos orgánicos sobre la superficie húmeda de manera óptima para que los microorganismos colonicen las superficies pulidas formando una matriz gelatinosa.

Acumulación: Se tiene un crecimiento logarítmico de los microorganismos, aumentando el grosor de la película, haciendo factible la generación de los estratos más profundos de procesos anaerobios.

Estabilización: En esta fase se mantiene un espesor constante, esta condición de estabilidad persiste hasta que los nutrientes difundidos a través de la biopelícula se terminen. En ese momento los organismos de las capas basales mueren. La integridad estructural de la base de la película se pierde y ocurre un desprendimiento masivo (Luna et. al., 1990).



Gráfica 5.1 Curva típica de desarrollo bacteriano

Dentro de los fenómenos que se dan lugar, cuando la biopelícula entra en contacto con el agua residual, sustrato y oxígeno son los siguientes:

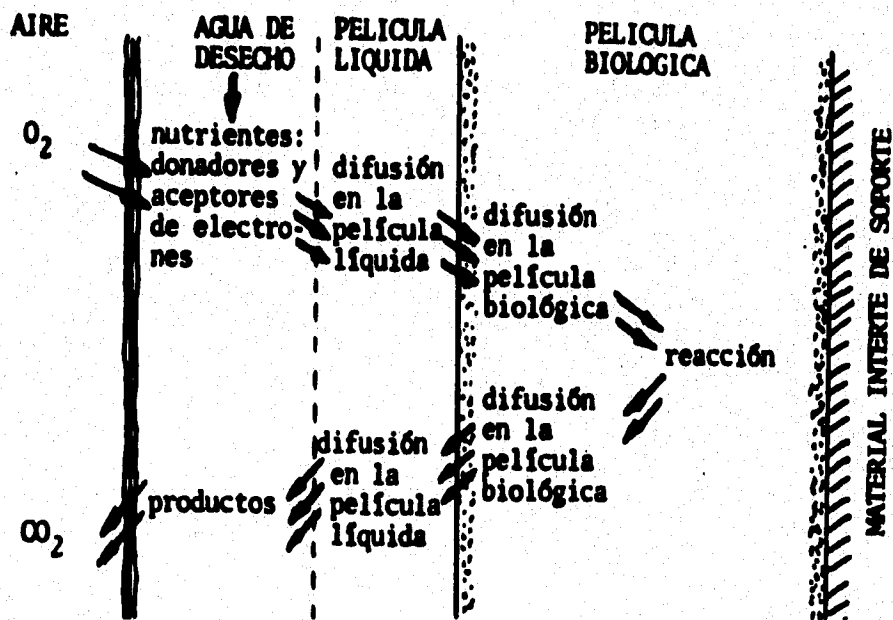


Figura 5.2 En la siguiente figura se puede apreciar la difusión de oxígeno y otros nutrientes a partir de las aguas residuales a la superficie de la biopelícula (Harremoës, P., 1978)

El agua residual contiene a los nutrientes, los cuales se difunden a través de la película líquida que se forma sobre la biopelícula. De forma similar el oxígeno del aire se difunde a través de la película líquida para, junto con los otros nutrientes, alcanzar la biopelícula en la cual se difundirán hasta las paredes celulares. 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 útiles, los cuales se difundirán, primero a través de la película líquida para quedar en suspensión o solución o para ser arrojados al aire (González, S. y Díaz, L; 1985)

El crecimiento de la biopelícula se debe a la ingestión de sustancias como materia orgánica, oxígeno, elementos traza., los cuales son requeridos por la actividad biológica a través de la fase líquida que es le fuente de contacto. Estas sustancias chocan contra la biopelícula y viajan a través de ella, por difusión molecular son ingeridos y metabolizados. Si las sustancias orgánicas son coloidales entonces no se difundirán directamente dentro de la biopelícula y tendrán que ser hidrolizadas a moléculas más sencillas para poder ser difundidas y metabolizadas (Shigehisa, I.D. y Takane, K. D., 1994).

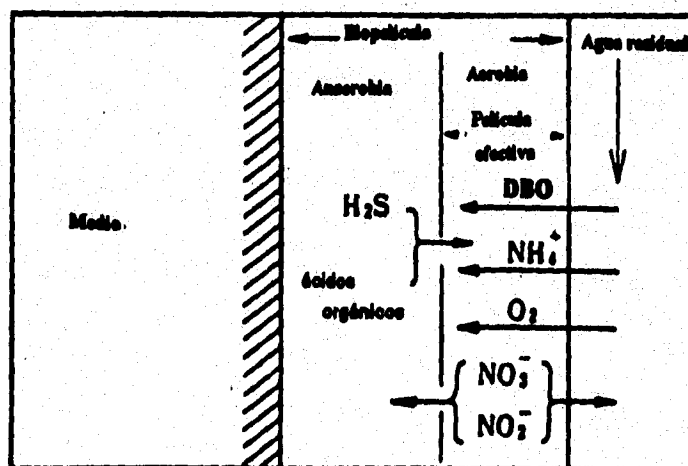


Figura 5.3 Difusión de nutrientes en la biopelícula
(Shigehisa, I.D. y Takane, K. D., 1994)

Como los microorganismos de la biopelícula consumen nutrientes y oxígeno, ellos se reproducen y la película aumenta en grosor, (ver Figura 5.4). Cuando la biopelícula tiende a ser demasiado gruesa, el oxígeno disuelto es consumido antes de que penetre hasta la base de la película, entonces comienzan a formarse condiciones anaeróbicas en la profundidad de la biopelícula. Esta parte de la biopelícula queda privada de nutrientes porque muchos de los orgánicos son metabolizados antes de que puedan llegar al fondo de la biopelícula. Privados de nutrientes y oxígeno, los microorganismos aeróbicos del interior de la biopelícula mueren y pierden su habilidad para limpiar el medio. Al mismo tiempo, los microorganismos anaeróbicos predominan sobre los aerobios produciendo gases lo que provoca que pierdan adherencia entre sí.

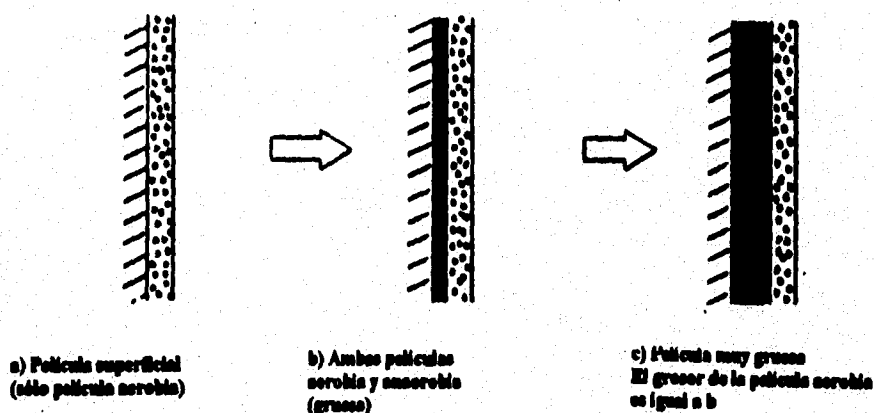


Figura 5.4 Grosor de biopelícula. aeróbica y anaeróbica
(Shigehisa, I.D. y Takane, K. D., 1994)

5.3.2 Parámetros que influyen en el desarrollo de la biopelícula

El contenido de materia orgánica en el hábitat, influye en gran parte sobre la densidad y composición de la flora microbiana; por otro lado, los factores abióticos también alteran significativamente a la comunidad y a su potencial bioquímico. Entre las variables principales del medio están: la aereación, temperatura, materia orgánica, acidez y suministro de nutrientes inorgánicos y sus combinaciones, aquí solamente se mencionarán a las más importantes.

Temperatura

Además del alimento y del oxígeno, las bacterias requieren de cierta humedad, y para lograr una eficiencia máxima en su función las bacterias necesitan de una temperatura favorable. Las bacterias son muy susceptibles a los cambios de temperatura, en lo que respecta a su velocidad de desarrollo y reproducción. La mayoría de las bacterias prosperan a temperatura de 20 a 40 °C a éstas se les conoce como *mesofílicas*. Otras bacterias viven mejor a altas temperatura, 55 a 60 °C son las *termofílicas*. algunas bacterias sus condiciones óptimas están entre 0 a 5 °C y se les conoce como *psicrofílicas*. Se ha observado que la temperatura rige todos los procesos biológicos, además la temperatura también determina la velocidad de los procesos bioquímicos que lleva a cabo la flora bacteriana (Alexander, M., 1980), (Departamento de Sanidad del Estado de Nueva York, 1990).

Se mencionó una clasificación de las bacterias según la temperatura pero también tiene un efecto importante en la actividad de la macro-fauna. Al rededor de los 10° C la actividad animal es mucho más reducida y esto es usualmente reflejado por un marcado incremento en acumulación de biopelícula. Siendo el invierno el periodo más crítico.

Por otro lado, se ha demostrado una asociación entre el tamaño de la comunidad y la temperatura, existiendo efectos no sólo cualitativos sino cuantitativos.

pH

Las condiciones altamente ácidas o alcalinas tienden a inhibir muchas de las actividades bacterianas comunes, mientras mayor es la cantidad de iones hidrógeno menor es la comunidad bacteriana. Para la mayoría de las especies, el pH óptimo está cercano a la neutralidad (Alexander, M., 1980).

En medios acuáticos, el pH no sólo afecta a los organismos directamente, sino también al equilibrio entre los iones de bióxido de carbono, bicarbonato y carbonato y, por lo tanto la disponibilidad de bióxido de carbono para los

productores primarios. El pH también afecta la solubilidad, y por lo tanto la disponibilidad, de muchos nutrientes esenciales para la actividad microbiana (Campbell, R., 1987).

Adherencia

La adherencia de la película microbiana sobre una superficie sólida es uno de los factores importantes del proceso de biopelícula, ya que afecta severamente la tasa de crecimiento y la dificultad relativa de secreción de la misma. Existen dos factores que afectan la adherencia de la biopelícula:

1 La acción electrostática

La carga eléctrica sobre la superficie de los microorganismos es causada por la disociación eléctrica de radicales como los amino, carboxilo, fosfato y semejantes, es así como la carga eléctrica es afectado por el pH de la solución.

La superficie de un microorganismo tiene una carga eléctrica positiva si el pH de la solución es más bajo que el valor al cual la superficie no ha cambiado eléctricamente (punto isoeléctrico) y vice versa. Mientras los puntos isoeléctricos de la superficie de los microorganismos se encuentren en un rango ácido (pH 4-5), un microorganismo celular en el agua más neutral es considerada como una partícula coloidal con cierta carga eléctrica negativa. Entonces una fuerza de atracción entre un microorganismo celular y una partícula o superficie con una carga eléctrica positiva, pueden adherirse fácilmente. Por otro lado la adherencia de un microorganismo sobre una partícula o superficie con una carga eléctrica negativa es muy difícil de observar. La mayoría de las bacterias, y quizá también los hongos, tienen superficies cargadas negativamente a pH fisiológico, debido al predominio de los grupos aniónicos (COO^-) en los polímeros de sus paredes.

2 Hidrofobicidad

Como una regla general, la atracción de dos sustancias hidrofóbicas o de dos sustancias hidrofílicas, pueden permanecer estables desde el punto de vista de energía libre. La atracción por dicho mecanismo se le ha llamado *interacción hidrofóbica*.

Acerca de las características físicas de las superficies sólidas que pueden afectar la adherencia de la biopelícula, la rugosidad es una de las cuales puede ser mencionada. La superficie rugosa tiene un efecto importante en el periodo primario de la formación de la biopelícula y la adherencia sobre una superficie rugosa es mayor que una superficie lisa, sin embargo, la rugosidad no es un factor determinante sobre la cantidad total de biopelícula formada

Cabe mencionar que no solamente los cambios fisico-químicos son determinantes para el establecimiento de las colonias, sino que es todo un conjunto de relaciones a nivel individuo y población, es decir, de las relaciones biológicas que surgen dentro de la comunidad biológica, estableciendo un equilibrio entre las poblaciones.

5.4 *Ecología de poblaciones*

Hablar de *ecología* implica una serie de múltiples y diversas interrelaciones entre organismos y el medio en que viven. En el presente estudio se hará énfasis en el mundo microbiano.

La ecología microbiana incluye a las bacterias, hongos, protozoarios y algas, cuyo intervalo de tamaño es de menos de una micra a unas cuantas decenas de micra, y muestra una gran diversidad en cuanto a requerimientos para la vida y su tolerancia a condiciones desfavorables (Campbell, R., 1987).

Debido a la gran diversidad morfológica y la capacidad química encontrada en los microorganismos, éstos pueden vivir, o al menos sobrevivir, en gran variedad de hábitats, constituyendo su ecosistema.

Los ecosistemas nunca son estáticos, sino que pueden estar en un estado de equilibrio dinámico que refleja los complejos mecanismos de retroalimentación negativa que controlan el número o la actividad de los individuos, o bien la población puede cambiar en una forma que refleje los cambios en los niveles de materia y energía dentro del medio.

Los términos **población** y **comunidad** se mencionarán con frecuencia más adelante por lo que definiendo en términos de ecología, una población es un conjunto de individuos panmícticos de una especie que ocupan un hábitat.

Una comunidad es un conjunto de poblaciones definida en términos de especie y abundancia, que viven en un **hábitat**; los hábitats y sus comunidades casi siempre se convierten gradualmente unas en otras. El **nicho** es más difícil de definir, es la suma de las variables fisiológica, ambiental y temporal que define la posición de una población en una comunidad; es la función de un individuo o una población en relación con otros en la comunidad.

5.4.1 Relaciones biológicas

Existen diferentes tipos de relaciones entre organismos, las cuales se pueden dividir en tres tipos principalmente:

Las positivas. Son aquellas en que ambos o un miembro de la relación recibe beneficio, también se les conoce como **simbiosis**.

Las neutrales son relaciones comunes en donde los miembros ni se perjudican ni se benefician, pero que comparten el mismo hábitat.

Las negativas son las relaciones que más nos preocupan, cuando se habla de un tratamiento biológico ya que en estas relaciones algún miembro de la relación se ve perjudicado y con ello puede llegar a afectar todo el proceso. En cuanto a relaciones negativas, podían resumirse en los siguientes tipos: **competencia, amensalismo, parasitismo y predación**.

Aunque no siempre la competencia se puede considerar como negativa, se ha podido observar que siempre y cuando las condiciones ambientales no sean tan extremas, habrá competencia entre los miembros de una comunidad por las fuentes de nutrientes y energía que son escasas. Si los factores abióticos y los suministros de nutrientes son favorables, entonces los microorganismos se multiplicarán y competirán por el espacio.

Algunas de las características que hacen a los microorganismos buenos competidores, son las siguientes:

- 1 Requerimientos de nutrientes moderados y una amplia tolerancia de condiciones ambientales.
- 2 Tasas de crecimiento rápidas y reproducción rápida.
- 3 Capacidad de producir toxinas y al mismo tiempo tolerancia a las toxinas de otros organismos, de modo que pueden colonizar microhábitats ocupados.

Cuando existe competencia puede haber una variedad de resultados, el más obvio es que el microorganismo se adapte y crezca mejor que otros excluyendo a todas las demás, es a lo que se le llama ***exclusión competitiva***.

Otro caso es cuando cambian las condiciones ambientales esto puede ocasionar el establecimiento de otro microorganismo distinto con una alta tasa de crecimiento y conducir a una nueva especie, lo que se conoce como ***sucesión*** (Figura 5.5).

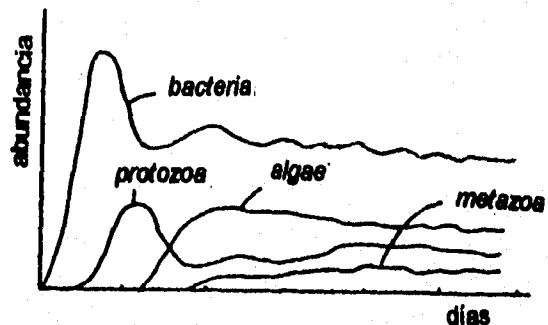


Figura 5.5 Sucesión de microorganismos constituyentes de la biopelícula
(Shigehisa, I.D. y Takane, K. D., 1994)

Aunque se ha utilizado el término *simbiosis*, como sinónimo de *mutualismo*, en el cual ambos organismos se benefician, en realidad se ven involucradas ambas relaciones positivas: *mutualismo* y *comensalismo*. En las interacciones *comensales* un organismo se beneficia mientras que el otro aparentemente no sufre alteración alguna, el fenómeno inverso a éste es el *amensalismo*, en el cual un organismo es afectado mientras que el otro no lo es. En el *parasitismo* y la *depredación*, un organismo se beneficia y el otro es afectado o incluso muere.

El grado de dependencia varía mucho; puede haber una asociación poco estrecha, en la cual las actividades de un microorganismo haga del hábitat más propicio para otro, aunque ninguna dependa de la otra, este tipo de interacción es muy común en poblaciones mixtas. Una forma menos común es la relación estrecha del metabolismo llamada *sintrofia*, de modo que dos organismos se encuentran a menudo juntos y son más productivos en combinación que separados (Campbell, R., 1987).

Ejemplos sobre estas interacciones se pueden mencionar, las alteraciones del medio en contra de ciertos grupos microbianos que pueden presentarse a través de la síntesis de productos metabólicos que inhiban o eliminen células microbianas, tal es el caso de los antibióticos. De igual manera no son raras las relaciones de parasitismo y predación; éstas se observan en la ingestión de bacterias por los protozoarios, el ataque de hongos sobre nemátodos, la digestión de hifas por las bacterias y la lisis de bacterias y actinomicetos por los bacteriófagos (Alexander, M., 1980).

5.4.2 Estratificación de poblaciones a nivel biopelícula

El hombre busca continuamente la manera de manipular a los microorganismos desintegradores, en especial para el tratamiento de aguas residuales; relacionando la fragmentación del material con el incremento de su área expuesta al ataque microbiano por bacterias y protozoarios principalmente (Campbell, R., 1987).

En 1964 James encontró que las especies dominantes en la biopelícula fueron Gram-negativas, las cuales crecen en óptimas condiciones a 22°C; se encontraron los géneros *Achromobacter*, *Flavobacterium* y *Zooglea* además de las formas filamentosas como *Sphaerotilus natans* y *Beggiatoa*; así como bacterias autótrofas como *Nitrosomonas* y *Nitrobacter* existen evidencias de que estas últimas son comunes en la profundidad de la biopelícula donde se lleva a cabo la nitrificación (Curds, C.R. y Hawkes; 1983).

La capa superficial de la biopelícula es verde, ya que está expuesta a la luz solar la cual estimula el crecimiento algal. La capa siguiente es típicamente gris o café grisáceo (WPCF, 1988). Las algas se concentran en la parte superior del filtro y pueden ser importantes para el suministro de oxígeno. Por otro lado, cuanto más contaminada es el agua proliferarán algas del formas filamentosas como: *Spirogyra*, *Ulothrix* y las cianobacterias *Lyngbya* y *Phormidium*.

Los hongos también son comunes en la película superficial y, de hecho pueden crecer demasiado y bloquear el filtro. Las especies dominantes de hongos son afines a la flora terrestre. A medida que aumenta la cantidad de materia orgánica se pueden encontrar hongos que se conocen como: *hongos de aguas negras*, lo que en realidad es una integración de organismos, incluyendo el hongo *Leptomitius lacteus* y a la bacteria *Sphaerotilus natans* junto con protozoarios asociados, especialmente ciliados como *Colpidium*. A niveles elevados de materia orgánica, el agua se torna anaeróbica y hay un denso crecimiento de *Sphaerotilus*, otras bacterias anaeróbicas y ciliados (Campbell, R., 1987).

Se pueden presentar problemas cuando las principales bacterias, los bacilos gram negativos, son sustituidos por bacterias filamentosas u hongos, lo que propicia que se formen grandes volúmenes de lodo, reduciendo la eficiencia de la aereación.

En resumen, la población biológica de la primera capa de la biopelícula consiste de varias especies de bacterias heterótrofas, algas, pequeñas poblaciones de protozoarios y hongos; encontrando en menor proporción microorganismos autótrofos nitrificantes

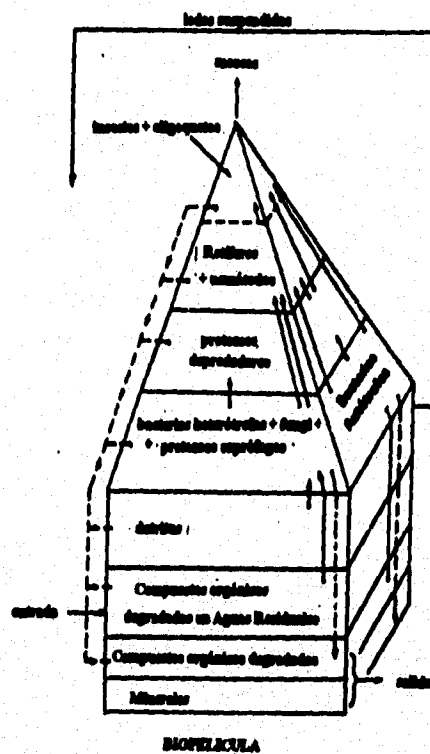


Figura 5.6 Pirámide alimenticia del biodisco

Por otro lado, se ha observado que la capa superior está compuesta de una matriz entrelazada de bacterias filamentosas, mientras que el estrato inferior contiene bastones rectos (bacilos) y en forma de coma (vibriones). En los procesos de tratamiento biológico de biopelícula coexisten tanto bacterias aeróbicas como anaeróbicas; ya que la profundidad de la biopelícula es

mayor, el oxígeno disuelto penetra generalmente por difusión solo en la parte superficial y a muy poca profundidad.

Las bacterias plantónicas son principalmente gram negativas (80 por ciento a 95 por ciento) y a menudo son móviles, pleomórficas y pigmentadas, se reconocen principalmente: *Pseudomonadas*, *Corynebacteriaceae* y *Micrococcaceae* (por ejemplo, *Arthrobacter*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Sarcina*, *Spirillum* y *Vibrio*). Las bacterias productoras de esporas (*Bacillus* y *Clostridium*) son importantes, en cuanto bacterias características de aguas residuales domésticas predominan *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris* y *Streptococcus faecalis*. Por lo general son muy eficientes para remover la materia orgánica, tienen muy bajos requerimientos de nutrientes y oxígeno, bajas demandas de mantenimiento, y un tiempo de duplicación muy prolongado. Las bacterias que se reproducen por gemación y las que producen prostecas (*Caulobacter*, *Hyphomicrobium*) también son comunes.

En las aguas residuales predominan en número y actividad las bacterias heterótrofas, hay más cianobacterias (*Aphanthece* y *Nostoc*) en tratamientos aeróbios junto con clorofitas y euglenoides; éstas se localizan exactamente donde la temperatura, luz, alcalinidad y concentración de ácido sulfhídrico están dentro de sus límites de tolerancia (Campbell, R., 1987).

En los procesos biológicos de depuración de aguas residuales muchos protozoarios juegan un papel importante en la remoción de la materia orgánica sólida, muchos ciliados y amebas, lo mismo que algunos flagelados, engloban fragmentos de detritos, y hay una gran variedad de protozoos de los tres grupos que son capaces de tomar la materia orgánica y utilizarla como fuente de energía. Estos microorganismos compiten con bacterias, hongos y otros organismos por el aprovechamiento de la materia orgánica muerta.

Los protozoarios se alimentan de detritos, bacterias y algas pequeñas, también compiten por nutrientes solubles. Pueden ser autótrofos, en su mayoría los fitomastigóforos y los productores primarios, saprozoicos que

dependen del complejo orgánico disuelto del desecho como *Polytoma sp*, *Chilomonas sp*, y *Polytomella sp* (Kudo, R., 1972).

Con respecto a su hábitat, los protozoos pueden dividirse en protozoos de vida libre como los que se encuentran en cualquier cuerpo de agua, en agua dulce dominan los ciliados (*Colpidium*, *Euplotes*) y dinoflagelados no pigmentados; los sarcodinos están representados por los heliozoarios y las amibas testadas (*Arcella*, *Diffugia*) además en sistemas de tratamiento se pueden encontrar: *Paramecium sp*, *Vorticella sp*, *Euglena sp*, y otros que ya se han mencionado; así como los parásitos de importancia médica como la disentería amibiana, la giardiasis y otras (Campbell, R., 1987).

Otro papel importante de los protozoarios en esos sistemas es como eslabón de la cadena alimenticia, ya que una gran cantidad de protozoos se alimentan de bacterias, y a través de ellos parte de la energía consumida en el grupo de los descomponedores se dirige a niveles tróficos superiores de la cadena alimentaria, otros metabolizan la materia orgánica, de esta manera representan un doble papel: como consumidores y descomponedores (Kudo, R., 1972).

El control del grosor de la biopelícula es un importante factor en el funcionamiento de los sistemas de película fija. El grosor de la biopelícula dependerá entre otras cosas de los organismos *podadores* (gusanos, larvas y rotíferos) o por inducción hidráulica a través del incremento de la tasa de flujo. Los podadores forman un importante factor para los sistemas con muy baja carga hidráulica.

El *forrajeo* puede ser un factor determinante para mantener en equilibrio a la comunidad; el forrajeo selectivo puede afectar la competencia de especies y la sucesión.

El control del grosor de la biopelícula es un importante factor en el funcionamiento de los sistemas de película fija. El grosor de la biopelícula dependerá entre otras cosas de los organismos *podadores* (gusanos, larvas y rotíferos) o por inducción hidráulica a través del incremento de la tasa de

flujo. Los podadores forman un importante factor para los sistemas con muy baja carga hidráulica, (WPCF, 1988).

El *forrajeo* puede ser un factor determinante para mantener en equilibrio a la comunidad; el forrajeo selectivo puede afectar la competencia de especies e incluso la sucesión

En los procesos de tratamiento de desechos frecuentemente representada por los ciliados como *Amphyleptus sp*, *Litonotus sp*, y *Trachelophyllum sp* depredadores, son generalmente peritrico sésiles. Algunos son carnívoros como *Blepharisma sp*, *Stentor sp*, y *Stylonychia sp*.

Cuando las condiciones son bajas en oxígeno disuelto, existen deficientes concentraciones de nutrientes o bajos valores de pH favorecen el crecimiento de hongos o bacterias enquistadas que pueden ser las poblaciones predominantes. Entonces el funcionamiento del sistema se reduce, ya que las reacciones metabólicas de estos organismos son muy lentas.

Nuevamente se observa que el medio determinará el tipo de microorganismo, así como su grado de predominancia o adaptación.

Los metazoarios como nemátodos, rotíferos y crustáceos tienen un papel importante en los procesos de película fija ya que algunos se alimentan de bacterias, manteniéndolas a un máximo nivel de reproducción. Algunos otros microorganismos como los gusanos al remover constantemente la biopelícula a causa de su movimiento permiten la difusión de oxígeno hacia las capas más profundas de ésta, favoreciendo consecuentemente la descomposición de la materia orgánica por vía aerobia (Norouzian, M., 1984b).

Los metazoarios (Rotatoria, Nemátoda, Insecta, Crustacea, Oligochaeta, etcétera) los cuales tienen un amplio rango de tallas desde numerosos milímetros a algunos centímetros son quienes predan la biopelícula constantemente, disminuyendo considerablemente la producción de lodos; si se cuenta con una amplia biota y una gran diversidad se tendrá un

sistema estable y equilibrado. Dichas bacterias, que utilizan sustratos lentamente asimilables o sustratos con un bajo valor en la tasa de crecimiento, siempre tienen una tasa de crecimiento relativamente pequeña. Entonces los procesos de biopelícula tienen un excelente funcionamiento en la remoción de dichos sustratos (Shigehisa, I.D. y Takane, K. D., 1994).

Bajo ciertas condiciones, de temperatura y calidad del agua los metazoarios proliferarán convirtiéndose en predadores de la biopelícula. Se han clasificado dos grupos de predadores que viven en la biopelícula; uno de ellos se alimenta de bacterias suspendidas y excretas consecuentemente aumenta y acelera la purificación del agua, el otro grupo se alimenta de bacterias floculantes en la película microbiana lo que provoca la dispersión de la biomasa. La alta transparencia del efluente se debe a la actividad química de la mineralización de la materia orgánica así como cuando los dos grupos de predadores actúan de manera balanceada.

La relación entre artrópodos y microorganismos es variable; esto depende de la especie y tipo de hábitat, pero puede tener grandes efectos en la biomasa y en la actividad microbiana. Se sabe que en el agua se encuentran bacteriófagos, los cuales atacan a las eubacterias, actinomicetos y cianobacterias; los virus de animales se encuentran con facilidad (Campbell, R., 1987).

5.5 Biodisco y biopelícula

Los procesos de película microbiana también se dividen en procesos aeróbicos y anaeróbicos. Se habla de procesos de tratamiento aeróbicos cuando se tienen: filtros biológicos sumergidos con difusores de aire o aereadores mecánicos, filtros sumergidos en cama fija, también llamados procesos de oxidación por contacto. Los biodiscos son utilizados como tratamientos aeróbicos cuando los discos están expuestos parcialmente a la atmósfera y cuando los biodiscos están completamente sumergidos se habla de un proceso anaeróbico (Shigehisa, I.D. y Takane, K. D., 1994).

El sistema de Biodiscos consta de una película de lama microbiana, un medio de soporte parcialmente sumergido, (aproximadamente el 40 por

ciento de la superficie total) que gira lentamente sobre un eje horizontal, de un tanque, a través del cual fluyen las aguas residuales. El tanque se encuentra dividido en 3 ó 4 etapas, cada una especializada en degradar un sustrato diferente. La película de lama se ve expuesta sucesivamente a los nutrientes en las aguas residuales y al aire según gira dentro del medio; esta película puede medir de 1 a 4 mm. este proceso se lleva a cabo en aproximadamente una semana (Autotrol, 1978).

En operación el crecimiento microbiano se adhiere a las superficies de los discos y eventualmente forma una lama sobre la superficie completa de los discos. La rotación del conjunto de discos alternativamente pone en contacto a la biomasa con los materiales orgánicos en el agua residual y con el oxígeno al ponerse en contacto con el aire atmosférico. Esta gran población microbiana es capaz de remover hasta un 90 por ciento la demanda bioquímica de oxígeno (DBO) en tiempos de retención relativamente cortos.

La rotación del biodisco afecta la transferencia del oxígeno y el mantenimiento de la biomasa en condiciones aeróbicas. La rotación por otro lado, también es el mecanismo para remover el exceso de sólidos a partir de los discos por los esfuerzos cortantes que mantienen los sólidos en suspensión, (Metcalf y Eddy, 1985)

En los Estados Unidos y el Canadá, el 70 por ciento del sistema de biodisco es enfocado para remover únicamente DBO carbonácea, el 25 por ciento para una combinación de DBO carbonácea y nitrificación y el 5 por ciento únicamente para nitrificación.

En el biodisco, cuando los discos salen del tanque con agua, los discos arrastran una capa líquida sobre la superficie de la película biológica, lo cual permite la oxigenación del agua y de los microorganismos debido a la sucesión de inmersiones y emersiones la capa líquida se renueva constantemente. La oxigenación se lleva a cabo por difusión a través de la película líquida que queda adherida a la biomasa. Los microorganismos utilizan el oxígeno molecular disuelto para efectuar la degradación aerobia de la materia orgánica. Cada vez que pasa por el agua de desecho, la

biomasa absorbe materia orgánica que se utiliza como fuente de nutrientes. Los principales productos de la oxidación bioquímica son: agua, bióxido de carbono y microorganismos que aumentan la población bacteriana, (González, S. y Castro, J., 1989).

Microorganismos + materia orgánica + O₂ →

Más microorganismos + Energía + CO₂ + H₂O + otros productos de desecho.

La microbiología característica de los biodiscos está aún poco estudiada, sin embargo, se menciona que los microorganismos de los sistemas de película fija son semejantes a aquellos de los lodos activados y que la diferencia estriba en la sucesión de comunidades ecológicas que se genera en los sistemas de película fija a diferencia de las poblaciones uniformemente mixtas de los lodos activados (Josephson, F., 1982)

Las observaciones al microscopio electrónico del barrido de una biopelícula proveniente del biodisco, revelan que dicha biomasa está constituida por capas estratificadas de organismos morfológicamente diferentes.

Se han reportado como especies dominantes en la superficie del biodisco bacterias filamentosas como *Beggiatoa sp.*, especies que predominan cuando existe SO₄ ó H₂S, y que reflejan condiciones de cargas de sustratos altos y disponibilidad baja de oxígeno (Alleman, et. al 1982)

Una revisión más completa acerca de la microbiología de un sistema de biodiscos es la de Noruzian (1983, 1984a, 1984b) en la cual se citan bacterias como: *Sphaerotilus sp.*, *Aerobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Enterococcus sp.*, *Beggiatoa sp.*, etcétera. Entre los protozoarios se pueden citar a *Paramecium sp.*, *Vorticella sp.*, *Cyclidium sp.*, *Tetramitus sp.*, y otros, además de metazoarios que incluyen nemátodos, rotíferos y crustáceos.

En el sistema de Biodisco de C.U. se pudo determinar que los protozoarios identificados en el sistema de biodiscos son de vida libre y están comprendidos dentro del sistema de los saprobios.

Se detectaron protozoarios caracterizados como anaerobios y aerobios facultativos, lo que indica la presencia de zonas anaerobias probablemente en el fondo de la biopelícula (Moreno, R., 1985).

La población biológica que se desarrolla en alguna etapa del biodisco refleja las condiciones ambientales y de carga. La configuración de las etapas en el biodisco es una parte integral del proceso de diseño del proceso, en general los diferentes tipos dependen del ambiente donde las diferentes cadenas de microorganismos pueden florecer en diferentes grados, variando de etapa a etapa el grado de este desarrollo en cada etapa depende primeramente de la concentración de orgánicos solubles. Como el agua fluye a través del proceso, cada etapa subsecuente recibe un influente con baja concentración orgánica que la etapa previa. Esta remoción orgánica por un medio de superficie dado hará que se incremente el número de etapas.

A simple vista revela una degradación por el grosor y el color de la biopelícula. Revelándose un enorme crecimiento en las primeras etapas La primera etapa propiamente se caracteriza por su color café grisáceo y las etapas terminales que son nitrificantes tiene un color bronce característico.

El mayor hecho de las aguas naturales es que contienen una amplia variedad de microorganismos formando un sistema ecológico balanceado.

En cuanto a su nutrición, la degradación de los materiales de desecho se relaciona directamente con su tamaño tan pequeño y su relativamente larga área superficial, en un volumen el cual incrementa su capacidad para el intercambio de nutrientes y catabolitos en un líquido en suspensión. Lo cual es de gran interés para la cinética y la naturaleza de la remoción de los sustratos en los procesos de tratamiento de aguas residuales. Dicha información es de uso directo para la construcción de modelos predictivos matemáticos para el tratamiento de agua. Donde estos modelos pueden relacionar el comportamiento de los microorganismos con la biomasa (sólidos suspendidos). La información es invaluable ya que puede ser directamente aplicada al diseño de proceso, aunque es incompleta ya que se están utilizando sustratos heterogéneos por una comunidad de diversos

microorganismos en la cual muchas de las bacterias no son viables. Y otra complicación es que los parámetros de operación de la planta fluctúan.

Usando los métodos ecológicos, uno observa un sistema completo en operación y trata de descubrir los caminos por los cuales el ecosistema reacciona como una respuesta al aplicar factores independientes.

Una de las dificultades en el estudio de las comunidades microbianas es el control de las variables que afectan su desarrollo, excepto la variable de interés cuando se estudia a partir de la existencia de interacciones entre especies además de causa como predación o excreción de metabolitos tóxicos y por la dependencia de ciertas poblaciones que excretan metabolitos por la presencia de otros (Curds, C.R. y Hawkes; 1975).

Es de esperarse que aún se encuentran soluciones a problemas agrícolas, tratamiento de aguas residuales, etcétera. pero se requiere mucha información básica acerca de los microorganismos tanto en ecosistemas naturales como artificiales, antes de que dichas soluciones se puedan desarrollar sobre bases racionales (Campbell, R., 1987).

6 CINÉTICA DE BIOPELÍCULA

Como hemos mencionado, la biopelícula crece en un medio superficial en donde ingiere sustancias como: materia orgánica, oxígeno, elementos traza, etcétera que requiere para su actividad biológica a partir de la fase líquida con la cual se encuentra en contacto. Cuando alguno de los componentes esenciales para la biopelícula no es suministrado, las reacciones biológicas no se llevarán a cabo.

Harremoës en 1978, determina que cuando el espesor de la biopelícula 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.

La tecnología de los procesos de tratamiento por biopelícula actualmente han tenido un gran impacto entre los biotecnólogos, en cuanto a técnicas

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

de inmovilización y aislamiento de microorganismos y enzimas; ya que la cinética de remoción de sustratos es llevada a cabo a nivel celular y enzimático; donde la característica más importante de las reacciones que ocurren en una célula viva es la participación de estas proteínas biocatalíticas, llamadas **enzimas** (Shigehisa, I. y Takane, K., 1994), (Bohiski, R., 1982).

6.1 *Enzimas*

Las enzimas no se hallan distribuidas al azar en el interior de la célula, sino que se localizan en compartimientos celulares especiales, y frecuentemente están dispuestos de manera ordenada dentro del esqueleto macromolecular de la célula y de los organoides celulares, constituyendo **sistemas multienzimáticos**. Los sistemas multienzimáticos más complejos están asociados con las membranas biológicas y los ribosomas, los cuales se disponen en una organización bidimensional (De Robertis R. & De Robertis E., 1985).

Siendo proteínas de cadena larga y pesos moleculares que van de, aproximadamente, 10,000 a 1 millón, cada enzima es única en términos de su estructura: en cuanto a su función son menos individualistas. Las características que las hacen distintas e inigualables son:

Primera.- Son los catalizadores mas *eficientes* conocidos hasta ahora por el hombre.

Segunda.- La mayoría se distingue por su *especificidad de acción*.

Tercera.- Y quizás la característica más notable, es que la actividad de las enzimas está sujeta a *regulación*; cuyo agente o estímulo regulatorio puede ser intracelular o extracelular (Bohiski R., 1982).

Las enzimas también se clasifican según las reacciones químicas en las que intervienen, de esta manera tenemos:

- 1) **Oxidoreductasas:** reacciones de oxido-reducción,
- 2) **Transferasas:** transferencia de grupos,
- 3) **Liasas:** adición de grupos a dobles ligaduras o remoción de éstos,
- 4) **Isomerasas:** catalizan isomerizaciones,
- 5) **Hidrolasas:** reacciones hidrolíticas y
- 6) **Ligasas o sintetasas:** condensan dos moléculas mediante la ruptura de una unión fosfato (De Robertis R. & De Robertis E., 1985).

Otro esquema de clasificación, puede basarse en la actividad catalítica propia de las mismas enzimas; dividiéndose en dos grupos:

- a) Aquellas cuyas funciones se deban exclusivamente a su naturaleza proteica.
- b) Aquellas que además de la característica anterior su actividad óptima depende de la presencia de una estructura no proteica y termoestable llamada **cofactor**. Los cofactores pueden ser de naturaleza muy variada desde simples iones inorgánicos (Zn, Mg, Mn, Fe, Cu, K y Na), grupos orgánicos más complejos; o bien los cofactores derivados de las vitaminas llamados **coenzimas** (Bohinski R., 1982).

Las coenzimas se unen a una proteína denominada **apoenzima**, las dos formas completan una enzima que se denomina **holoenzima** (Pelczar J., Reid D., y Chan S., 1992).

En este capítulo analizaremos de manera general las funciones catalíticas de las enzimas y su repercusión a nivel celular con la biopelícula.

6.2 **Cinética enzimática y metabolismo**

La cinética enzimática describe las propiedades catalíticas de las enzimas en el lenguaje de la cinética química, una rama especializada de la físico-

química relacionada con el estudio de las velocidades de reacción (Bohiski R., 1982).

Para iniciar la descripción, es necesario mencionar que las enzimas tienen uno o más lugares denominados **sitios activos** a los cuales se une el **sustrato** (es decir, la sustancia sobre la cual actúa la enzima). El **sustrato** es químicamente modificado y convertido en uno o más productos. Como esta reacción es en general reversible, puede escribirse de la siguiente forma:



donde:

E = Enzima

[ES] = Complejo enzima-sustrato intermedio

S = Sustrato

La enzima, como se han definido son sumamente específicas para su sustrato y frecuentemente no aceptan moléculas relacionadas o que tengan una forma ligeramente distinta, de tal manera que los **sitios activos** son complementarios para el sustrato. En algunas enzimas, el sitio activo es complementario del sustrato solo después que éste se ha unido. La unión con el sustrato induce un cambio de conformación en la proteína, y sólo entonces los grupos químicos esenciales para la catálisis entran en contacto íntimo con el sustrato (De Robertis R. & De Robertis E., 1985).

6.2.1 Reacciones involucradas

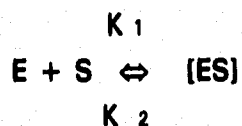
Desde principios de siglo, en 1903 Henri propuso el primer modelo para describir la degradación enzimática; posteriormente este trabajo fue confirmado, la existencia de un complejo enzima-sustrato [ES] en el sitio activo fue propuesto por Michaelis y Menten, en 1913, sobre la base de evidencias cinéticas, presentando una versión ligeramente modificada de la ecuación original. Este concepto resultó de gran importancia para la comprensión del mecanismo de las reacciones enzimáticas. La existencia del complejo se ha comprobado actualmente mediante espectroscopía y por el

sistema de aislamiento directo de derivados covalentes estables del complejo.

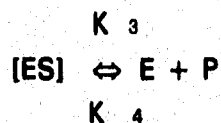
Considerando que la fase que controla la rapidez del proceso degradativo es la reacción enzimática entonces el proceso puede describirse por medio de la teoría de Michaelis y Menten.

La reacción enzimática se realiza en dos etapas:

La primera:



La segunda: Donde el complejo [ES] se desdobra en el producto y la enzima libre, que queda disponible para actuar sobre una nueva molécula de sustrato.

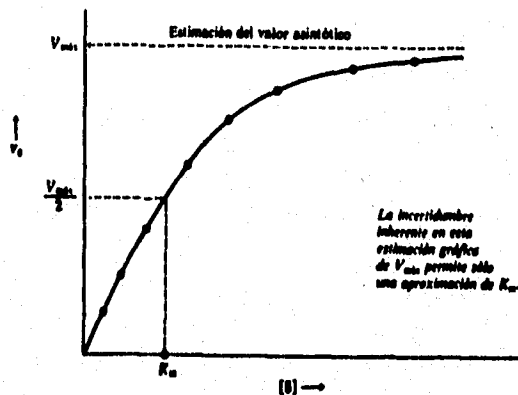


K_1 , K_2 , K_3 y K_4 son constantes de velocidad de las reacciones. Todos los pasos son reversibles, pero en general K_4 es despreciable, lo cual indica que la reacción sigue la dirección $ES \rightarrow E + P$.

6.2.2 Orden de reacción

Las reacciones se distinguen por su orden cinético, que especifica la dependencia entre la velocidad de la reacción y la concentración de los reaccionantes.

El orden cinético de una reacción se determina experimentalmente y representa un ajuste de los datos experimentales en una ecuación de velocidad de la reacción en cuestión.



Gráfica 6.1 Representación gráfica de la ecuación de Michaelis y Menten

Según se advierte en la (Gráfica 6.1), la velocidad (V) de la reacción depende de la concentración del sustrato, y la curva describe una hipérbola.

Cuando las concentraciones de sustrato son bajas, la velocidad inicial aumenta rápidamente y sigue las leyes de *una reacción de primer orden*, donde la velocidad es directamente proporcional a la concentración del reaccionante es decir, que la cantidad de un producto formado es proporcional a la concentración de sustrato [s].

Sin embargo, a medida que [s] aumenta, la curva se satura y alcanza un punto de equilibrio en el cual la velocidad ya no depende de [s]. En este momento, a causa del efecto del exceso de sustrato, toda la enzima se encuentra como complejo ES y se alcanza la velocidad máxima (Vmax) de la reacción a partir de este paso. La velocidad permanece constante sin importar la concentración del sustrato, estamos hablando de *una reacción de orden cero*.

La ecuación general, o de cinética enzimática de Michaelis y Menten de la curva es:

$$V = \frac{V_{max}[s]}{K_m + [s]}$$

Para muchas enzimas, la velocidad de la reacción depende de la concentración del sustrato. En este caso, la curva describe *una hipérbole* que alcanza una velocidad máxima (V_{max}) correspondiente a la saturación de todos los sitios activos. *El K_m (constante de Michaelis y Menten) es la concentración del sustrato a la cual se alcanza $V_{max}/2$.* Cuanto menor es K_m , mayor es la afinidad de la enzima por el sustrato. La cinética de una enzima depende en gran medida del pH y de la temperatura.

6.2.3 Análisis cinético Henri, Michaelis y Menten

La teoría de la cinética enzimática de Henri, Michaelis y Menten fue conceptualizada de las siguientes ecuaciones:

Henri:

$$v = \frac{k[s]}{1 + \frac{[s]}{k_s}} \quad \dots (i)$$

Donde

V = Velocidad
 k = constante
 k_s = constante de disociación del sustrato
 $[s]$ = Concentración de sustrato

Velocidad inicial

$$V = k_p [ES] \quad \dots (ii)$$

V = velocidad inicial
 k_p = Constante de disociación del producto
 $[ES]$ = Concentración enzima-sustrato

[ES]

$$[E]_T = [E] + [ES] \quad \dots (iii)$$

$[E]_T$ = concentración total de la enzima

[E] = concentración de la enzima
 [ES] = Concentración enzima-sustrato

Dividiendo (ii) entre (iii) en ambos miembros tenemos

$$\frac{v}{[E]_T} = \frac{k_p[ES]}{[E]+[ES]} \quad \dots(\text{iv})$$

Si

$$k_s = \frac{[E][S]}{[ES]} \Rightarrow [ES] = \frac{[E][S]}{k_s} \quad \dots(\text{v})$$

Sustituyendo en (iv) con (v)

$$\frac{v}{[E]_T} = \frac{k_p \frac{[E][S]}{k_s}}{[E] + \frac{[E][S]}{k_s}} \quad \dots(\text{vi})$$

Eliminando [E] en el segundo miembro

$$\frac{v}{[E]_T} = \frac{k_p[S]}{k_s + [S]} \quad \dots(\text{vii})$$

A partir de (ii) tenemos que

$$V_{max} = k_p [E]_T \quad \dots(\text{ii})$$

Por lo tanto, despejando [E]_T y sustituyendo en (vi); finalmente se tiene:

$$\frac{v}{V_{max}} = \frac{[S]}{k_s + [S]} \quad \dots(\text{viii})$$

k_s es lo que se conoce como K_m o *constante de Michaelis y Menten*.

$$\frac{v}{V_{max}} = \frac{[S]}{k_m + [S]} \quad \dots(2)$$

Hasta ahora se ha tratado el mecanismo general de las enzimas, sin embargo, existen variedades no sólo en composición sino también en función, tal es el caso de las **isoenzimas** y las **enzimas alostéricas**.

Las **isoenzimas**, son formas moleculares múltiples de una misma enzima, que difieren en su movilidad electroforética. Se conocen cinco isoenzimas de la deshidrogenasa láctica. Esta enzima es un tetrámero, y las cinco isoenzimas derivan de las varias combinaciones posibles entre las dos subunidades.

Las enzimas **alostéricas** o de regulación tienen una curva $V/[s]$ de tipo sigmoideal. Son oligómeros formados por dímeros, tetrámeros, o más subunidades proteicas. La unión de una molécula de sustrato a una de las subunidades aumenta la afinidad para la unión de una segunda molécula, y así sucesivamente. Estas enzimas tienen gran importancia en los mecanismos de regulación, ya que su actividad puede ser modificada por $[s]$ (Bohiski R., 1982), (De Robertis R. & De Robertis E., 1985).

6.3 **Metabolismo**

La célula puede compararse con un minúsculo laboratorio, en el cual tienen lugar la síntesis y degradación de un gran número de sustancias. Estos procesos son llevados a cabo por enzimas a la temperatura normal del organismo, con moderada concentración iónica y dentro de límites estrechos de pH.

El **metabolismo** puede definirse como la suma de todas las transformaciones químicas que ocurren en un organismo vivo. Comprende tanto los procesos de **catabolismo** por medio de los cuales las sustancias son degradadas, como los de **anabolismo**, que conducen a la síntesis de nuevos productos (Tabla 6.1).

TABLA 6.1 Diferencias fundamentales entre catabolismo y anabolismo

| | |
|--|--|
| Degradativo | Sintético |
| De naturaleza oxidativa | De naturaleza reductiva |
| Produce energía | Requiere energía |
| Variedad de compuestos iniciales con productos finales bien definidos | Compuestos iniciales bien conocidos con una variedad de productos finales |

Aunque cada reacción puede considerarse como una entidad separada de importancia individual, la expresión metabólica del organismo entero se debe a la integración de cada reacción individual en un circuito de reacciones dinámicas de diseño intrincado, gobernado mediante controles y equilibrios regulatorios sensibles.

- El control de miles de reacciones que ocurren en el interior de la célula se realizan principalmente por dos mecanismos: *el control genético y el control de la catálisis*.

El control genético involucra un cambio en el número total de moléculas de enzimas. Los ejemplos más conocidos son los de la *inducción* y la *represión* enzimática en microorganismos, en los que la síntesis de la enzima está regulada a nivel genético por la acción indirecta de ciertos metabolitos.

En la *inducción enzimática* la presencia del sustrato induce la síntesis de las enzimas que lo degradan; mientras que en la *represión enzimática*, la acumulación del producto final de una cadena metabólica, inhibe la producción de las enzimas. En ambos casos el resultado final es que las enzimas se sintetizan cuando son necesarias.

El control de la catálisis se produce por cambios en la actividad enzimática sin modificaciones en la cantidad total de moléculas de enzima presentes. Este cambio se logra por la *inhibición por retroalimentación, la actividad por precursor y la interconversión enzimática*.

En la inhibición por **retroalimentación (feedback)** el producto final de la vía metabólica actúa como un inhibidor alostérico de la primera enzima; de tal manera se consigue que la célula no produzca más metabolito del necesario.

Algunas enzimas se **interconvierten** de una forma menos activa a una activa. Con frecuencia esto se consigue mediante la fosforilación de la enzima. La fosforilación de las proteínas tiene lugar por proteinoquinasas que catalizan la reacción (De Robertis R. & De Robertis E., 1985).

De esta manera, aunque los dos tipos de actividades metabólicas poseen características diferentes se puede decir que son procesos integrados y complementarios en lo que es producido por el catabolismo es requerido por el anabolismo y viceversa. Esta integración del metabolismo proporciona un nivel óptimo de eficiencias metabólicas en la naturaleza, (Bohinski R., 1982).

6.3.1 Cinética de crecimiento

Algunos investigadores sugieren que todos los compuestos orgánicos contenidos en aguas de desecho municipales pueden ser metabolizados por microorganismos, a excepción de algunas sustancias recalcitrantes, las cuales no son susceptibles a un ataque enzimático (Diaz, L., 1987).

Como ya se ha mencionado, la nutrición y respiración microbianas se llevan a cabo a través de procesos de difusión. Los compuestos coloidales insolubles y las grandes moléculas orgánicas que por su tamaño no pueden atravesar la pared celular, se hidrolizan por enzimas extracelulares o enzimas ligadas a la pared o membrana celular. Las pequeñas moléculas resultantes de la hidrólisis se introducen entonces a la célula por diferentes mecanismos que van desde la difusión hasta el transporte activo por permeasas. Una vez en la célula, el sustrato se transforma y metaboliza por una serie de sistemas multienzimáticos, hidrolíticos, oxidativos y de síntesis (Nava C., 1992).

Durante el metabolismo aerobio los microorganismos requieren de oxígeno para llevar a cabo tanto sus funciones catabólicas como las anabólicas. **El anabolismo es la fase de construcción o fase sintética del metabolismo, también llamada biosíntesis.** En el anabolismo las moléculas pequeñas de los precursores se ordenan para llegar a constituir los componentes moleculares relativamente grandes tales como: polisacáridos, ácidos nucleicos, proteínas y lípidos.

La biosíntesis ocasiona un incremento en el tamaño y en la complejidad de la estructura, por lo tanto, precisa de energía libre, la cual es aportada por el ATP.

La energía se utiliza para construir las partes de una célula o la pared de la membrana. También es necesaria para la síntesis de las enzimas, ácidos nucleicos, polisacáridos y otros componentes químicos; lo mismo que para la reparación de daños o simplemente para mantener la estabilidad, o para el desarrollo y la multiplicación de la especie. Así mismo, para la acumulación de determinadas sustancias a alta concentración en la célula, mantener otras fuera de la misma y para la movilidad (Pelczar J., Reid D., y Chan S., 1992).

Dado que la glucosa es el combustible empleado con mayor frecuencia por la célula, ha sido exhaustivamente estudiada en el ámbito bioquímico, en lo siguiente se ejemplificará con ella estas dos vías metabólicas.

La síntesis celular ocurre durante tres fases, las flechas ascendentes de la figura 6.1 muestran las vías de síntesis o anabólicas. La síntesis se inicia en la tercera fase del metabolismo, en esta fase se generan moléculas precursoras. En la segunda fase estas moléculas se transforman en moléculas que sirven como base para formar macromoléculas en la primera fase (Lenhinger A., 1979).

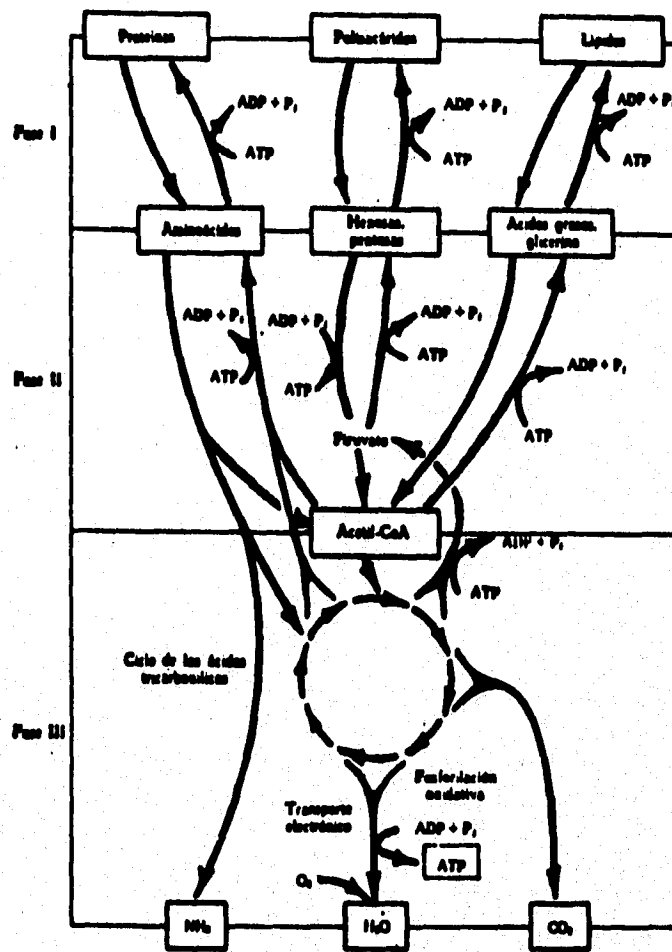


Figura 6.1 Metabolismo aerobio (Lehninger, A., 1979)

6.3.2 Cinética de degradación de contaminantes

La degradación de la materia orgánica en el metabolismo celular, tiene lugar a través de secuencias de reacciones consecutivas catalizadas enzimáticamente, en las cuales participan muchos compuestos intermedios (Gaudy A. y Gaudy E., 1981).

En el **catabolismo** o fase degradativa; las moléculas orgánicas como carbohidratos, lípidos y proteínas se degradan a productos más pequeños y sencillos, por ejemplo: ácido láctico, ácido acético o anhídrido carbónico. El catabolismo libera energía conservándose en forma de trifosfato de adenosina ATP (Lehninger A., 1979).

En cuanto a la glucosa, su metabolismo depende de la presencia o ausencia de oxígeno. Para tener un marco de comparación más generalizado se hará una breve comparación. La glucólisis anaerobia (fermentación) no requiere oxígeno, pero sólo recupera una pequeña fracción de la energía química de la glucosa. En presencia de oxígeno, por el contrario, la respiración aerobia oxida a la glucosa en CO₂ y H₂O, y se genera una cantidad mucho mayor de ATP (ver TABLA 6.2).

Tabla 6.2 Algunas diferencias entre la glucólisis anaerobia y la respiración aerobia

| | |
|---|--|
| No emplea O₂ | Emplea O₂ molecular |
| Degrada la glucosa en ácido láctico y otros compuestos orgánicos complejos | Degrada la glucosa en CO₂ y H₂O |
| Exergónica | Exergónica |
| Recupera poca energía química | Recupera 40% de la energía química |
| Enzimas localizadas en la matriz citoplasmática | Enzimas localizadas en las mitocondrias |
| Una molécula de glucosa produce 2 moléculas de ATP | Una molécula produce 36 moléculas de ATP |

Como ya se mencionó, en la glucólisis anaerobia, la glucosa es degradada en dos moléculas de ácido láctico. Este proceso ocurre en ausencia de O₂ y se produce en 11 pasos sucesivos que tienen lugar en la matriz citoplasmática. El resultado neto es la producción de dos ATP. En condiciones anaerobias, el producto final, el piruvato, se transforma en lactato, que actúa como aceptor de hidrógeno para 2 NADPH + H⁺. En presencia de O₂, el piruvato se convierte en CO₂ y acetil-coenzima A, que entra en el ciclo de Krebs.

El ciclo de Krebs ocurre en el interior de las mitocondrias y dentro de una compleja serie de reacciones donde participan 7 enzimas, degrada el grupo acetilo en 2CO₂ y 8 átomos de hidrógeno, éstos generarán 10 moléculas de ATP.

La cadena respiratoria, contiene una serie de subsistemas de oxidación-reducción (citocromos) transfiriendo electrones para producir H₂O. La

cadena respiratoria se encuentra en la membrana interna de la mitocondria. El balance energético final de la respiración aerobia es:



(De Robertis R. & De Robertis E., 1985).

De manera general se puede decir que mediante el esquema de la figura 6.1, donde 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 trifosfato de adenosina. La energía producida se utiliza para la síntesis de nuevo material celular y para propósitos de mantenimiento, como locomoción, calentamiento, etcétera (Lenhinger A., 1979).

6.4 *Respirometría*

El término respirometría se refiere a la medición del consumo de oxígeno por microorganismos aerobios, es decir, enzimas que requieren de oxígeno atmosférico que utilizan como último receptor de electrones, en sus procesos bioquímicos

Si se conoce el consumo de oxígeno con respecto al tiempo se podrá determinar la cinética de eliminación de sustrato, ya que el consumo de oxígeno es proporcional al consumo de sustrato.

6.4.1 Poblaciones y respiración

Wuhrmann (1964) define que el consumo total de oxígeno de una *población mixta* como las que se encuentran en las plantas de tratamiento de aguas residuales, 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; lo cual hace posible medir su valor cuando las células se encuentran en un medio libre de sustrato. Aunque la definición anterior puede considerarse exacta para cultivos puros no es posible aplicarla a cultivos de poblaciones mixtas en las cuales existan organismos depredadores, ya que ante la ausencia de nutrientes para bacterias y hongos, los bacteriófagos tienen suficiente alimento y consumen también oxígeno. Entonces la respiración endógena de poblaciones mixtas se considera como la respiración originada por la población cuando las bacterias y los hongos no tienen acceso a nutrientes exógenos. La respiración endógena no tiene 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, este tipo de respiración se le conoce como **respiración exógena**.

El consumo total de oxígeno o respiración total 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).

La **respiración de sustrato o respiración neta** es considerada, para fines prácticos, como la diferencia que existe entre la respiración exógena 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 del consumo de oxígeno.

En el caso de considerar a los contaminantes orgánicos contenidos en un agua de desecho como sustrato se presentan dos problemas:

1) La cuantificación de la concentración del sustrato es problemática debido a las características del material orgánico y

2) el sustrato nunca es consumido en su totalidad, lo que origina un remanente de material no biodegradable (González. S. y Diaz, L., 1985) (Nava C., 1992).

6.4.2 Sistema de experimentación, Respirómetro de Warburg

Los trabajos de respirometría en un principio se diseñaron para cultivos microbianos homogéneos suspendidos, conociéndose bajo el nombre comercial de SAPROMAT. Sin embargo, dada la época para sistemas de biopelícula ni siquiera era considerado. A principios de los 80's en el Instituto de Ingeniería de la UNAM, se adapta el sistema al proceso de biopelícula para biodisco; construido expresamente para la determinación de constantes cinéticas (González, S. y Diaz, L, 1985); más tarde se perfecciona el diseño del respirómetro de Warburg añadiendo un termostato y un serpentín de cobre para la regulación de la temperatura (Nava C., 1992).

Se utilizaron 6 frascos especiales como el descrito en la figura 6.2, y un sistema de tracción por medio de magnetos que permite operar 5 frascos de manera simultánea, el sexto frasco se utiliza como termobarómetro. El material utilizado en los frascos, los cuales se llamarán cámaras de reacción, es de acrílico transparente, así como el soporte del sistema de tracción.

Los cambios generados por variaciones de temperatura o presión son corregidos por el termobarómetro, cámara de reacción 6, ésta contiene agua destilada. Generalmente, en esta cámara se emplea un volumen de agua, igual al que se encuentra en el resto de las cámaras de reacción. Si el nivel del manómetro al cual está conectado se eleva, hay una disminución

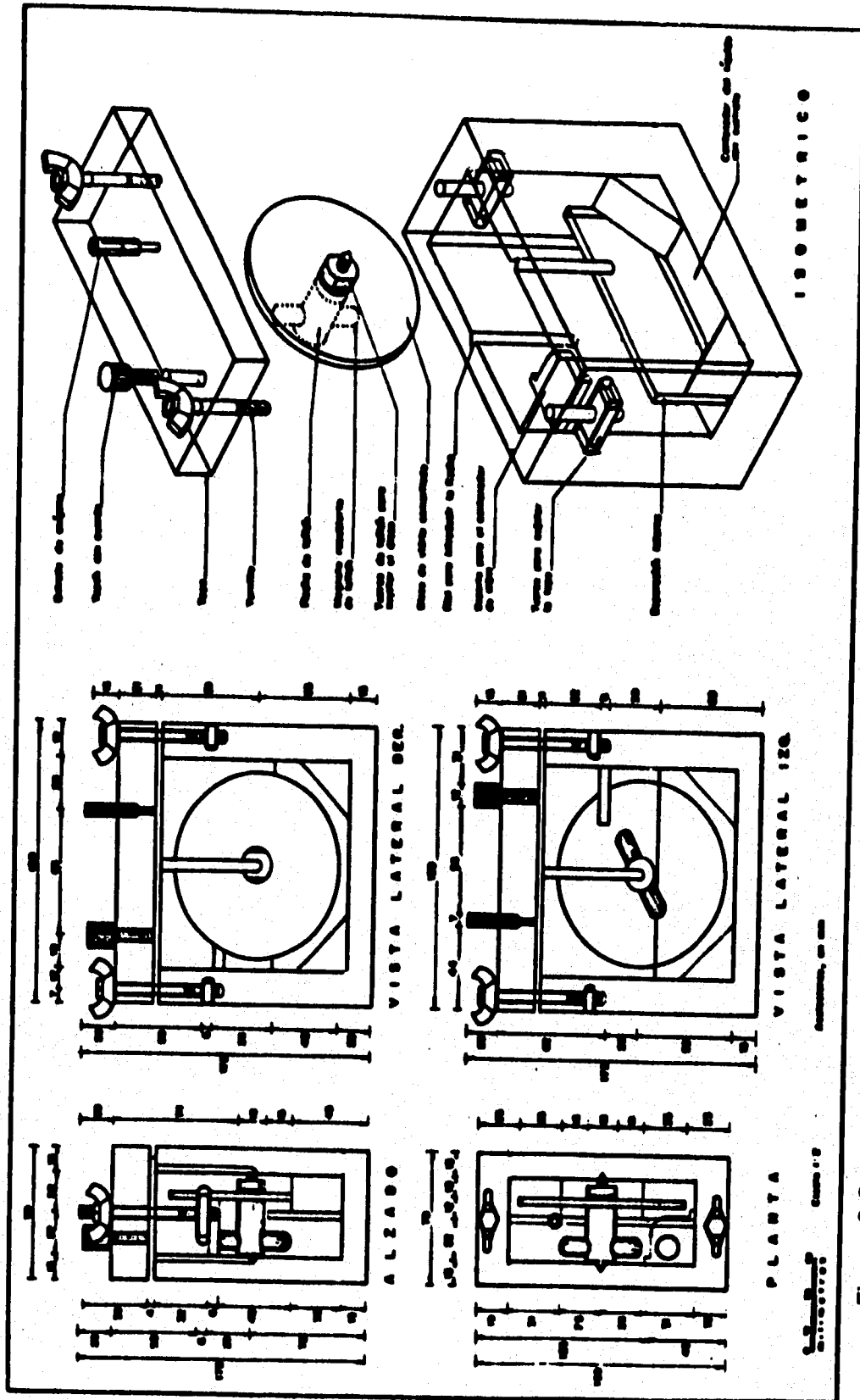


Figura 6.2 Diseño de las cámaras de reacción utilizadas en el Respirómetro Warburg, (González, S y Díaz, L., 1985)

en la presión ambiente o un incremento en la temperatura del baño y viceversa.

Dentro de cada una de las 5 cámaras, en la parte superior contienen un pequeño soporte, en el cual se colocará un recipiente de vidrio con algunas lentejas de hidróxido de potasio, el cual servirá para absorber el anhídrido carbónico generado durante la oxidación biológica. Como se puede apreciar en la figura 6.2 la cámara está dividida a su vez en dos secciones, una sección sirve para el libre giro del magneto dándole el movimiento a la flecha que contiene al disco con la biopelícula generada para el estudio, la otra sección contendrá la solución de sustrato.

El sistema de tracción consta de cinco poleas de aluminio con su respectivo magneto; el conjunto es accionado por medio de una banda de dacrón conectada a un motor de velocidad variable (González, S. y Díaz, L, 1985).

Todas las cámaras son sumergidas en un baño de agua a temperatura constante, y están unidas mediante conexiones especiales de vidrio a los manómetros.

Cada manómetro tiene una rama abierta y una cerrada la cual se conecta a la cámara. 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 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 Brodie y la solución de Krebs. Para este experimento se utilizó solución Brodie (Ver Figura 6.3).

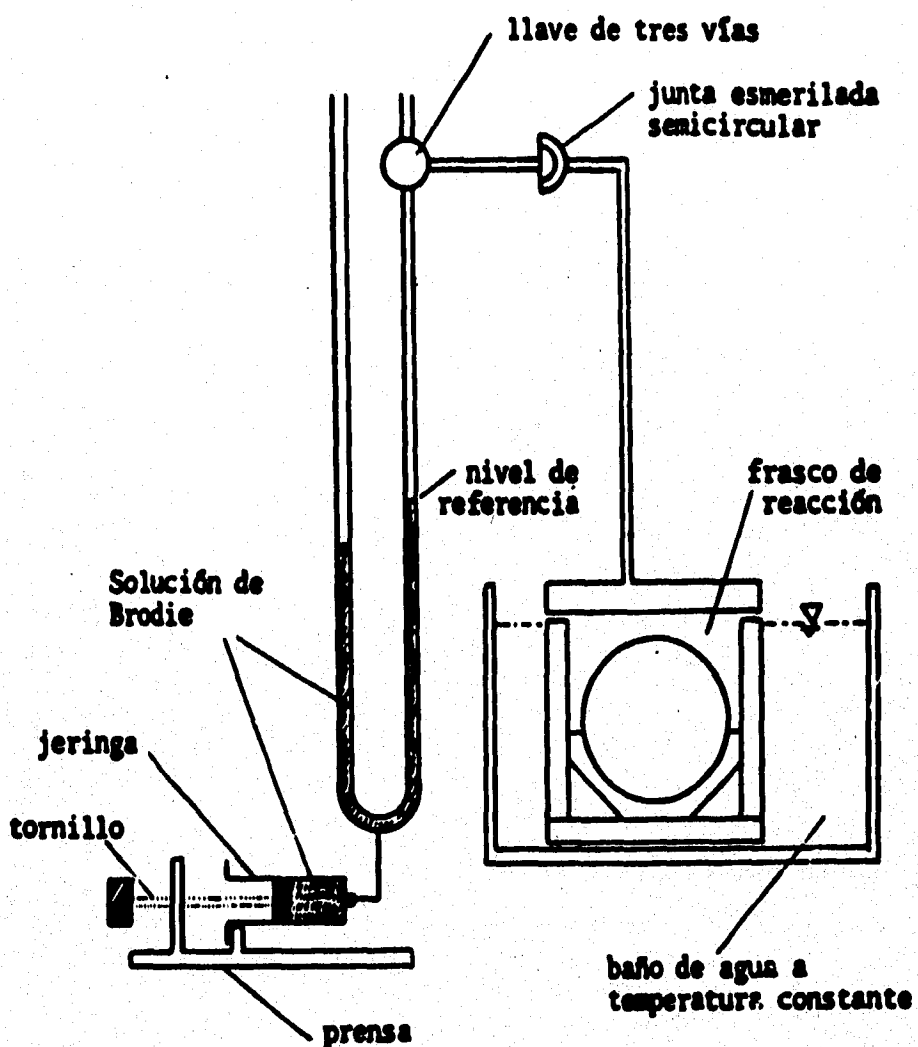


Figura 6.3 Unidad del Respirómetro Warburg, modificado

Los principales puntos que se verifican una vez armado el sistema son: el nivel del baño de agua, mantener controlada la temperatura de manera constante (termostato y serpentín) las revoluciones del mecanismo de tracción y el perfecto funcionamiento del termobarómetro.

Una vez armado el respirómetro de Warburg, se selecciona un punto de referencia en el manómetro (generalmente 250 ó 300 mm. en la rama cerrada), el cuál tendrá que ajustarse antes de registrar cualquier cambio de presión. En seguida se añade el sustrato; como el sistema de tracción se encuentra funcionando esto permite que se mezcle y entre en contacto con la biopelícula. Este procedimiento se toma como tiempo de inicio de reacción ($t=0$).

Para la toma de lecturas, se calibra con el tornillo del fluido manométrico para llevar a su nivel al punto de referencia en la rama conectado a la válvula de tres pasos y se mantiene ésta 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 de tiempo 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 de la cámara y se toma la lectura de la rama abierta.

7 METODOLOGIA

Para llevar a cabo esta investigación fué necesario dividirla en cuatro partes:

Primera parte: Análisis biológico

Esta parte consistió en la generación y el mantenimiento de la biopelícula dentro del sistema de tratamiento de BIODISCO.

Lo cual comprendió desde la adaptación al sistema de varios soportes hasta el tratamiento preliminar para los estudios de respirometría.

Segunda parte: Análisis químico

Selección de la sustancia tensoactiva que se utilizó, los rangos óptimos para la experimentación y la elaboración de los reactivos para respirometría.

Tercera parte: Análisis respirométrico

Esta abarcó el conocimiento, adaptación, dominio y manipulación del respirómetro Warburg para la obtención de las constantes cinéticas.

Cuarta parte: Generación y análisis matemático de los datos experimentales

Esta parte comprende todo el trabajo conceptual de los datos obtenidos del respirómetro Warburg, es decir, los valores de la respiración, su ajuste y el análisis cinético que explique el comportamiento obtenido.

Todos estos análisis se realizaron en su totalidad en las instalaciones de Ciudad Universitaria, lo cual involucró a la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de Ciudad Universitaria y las instalaciones del Instituto de Ingeniería de la UNAM.

A continuación se explicará con más detalle cada una de las técnicas utilizadas en cada uno de los análisis.

7.1 Materiales de estudio

Los materiales utilizados en la presente investigación comprendieron básicamente dos: las biopelículas generadas y el tensoactivo.

En cuanto, al agente tensoactivo, como se mencionó anteriormente en el capítulo 1; la selección se estableció dada la elaboración, el grado de ocurrencia y la problemática de los tensoactivos en los detergentes presentes en las aguas residuales domésticas.

Como se mencionó oportunamente fué el *alquil aril sulfonato de sodio (AAS)* el que se utilizó en la presente investigación. Para obtener este

tensoactivo en su forma químicamente pura se recurrió a QUÍMICA HOECHST DE MÉXICO, S. A. empresa que facilitó información sobre algunas características, las cuales se pueden apreciar en la Tabla 7.1.

Tabla 7.1 Características químicas de la sustancia activa comercial

| | |
|---|---|
| Nombre | fenilsulfonato |
| Composición | sal ácida de alquil aril sulfonato |
| Características físicas | Hojuelas blanco-amarillentas |
| Ionogenicidad | Aniónico |
| Solubilidad | Fácilmente soluble en agua fría y mejor en agua tibia. Preparaciones con más del 30% de producto, tiene consistencia pastosa; más diluido se vuelve más claro y con menos viscosidad |
| Reacción | En solución de neutra a ligeramente alcalina |
| Resistencia a la dureza del agua | Buena en agua dura, álcalis y sales neutras |
| Compatibilidad | Como producto aniónico puede ser combinado con jabones, otros detergentes aniónicos básicos y sustancias no iónicas; compatible con álcalis, silicatos, fosfatos, sulfatos, perboratos, abrillantadores y CMC |
| Actividad interfacial | Excelente humectación y espuma y un buen efecto de limpieza, el cual puede ser considerablemente incrementado por la adición de fosfatos polimerizados, silicatos y también de sustancias tensoactivas interfaciales del tipo no iónico. Por efecto sinérgico resultante en un mezcla de relación constante, el efecto de lavado sobrepasa al de los mismos materiales individualmente considerados |
| Aplicaciones | El fenilsulfonato siendo un alquil aril sulfonato del tipo queril, es particularmente adecuado para la preparación de detergentes universales líquidos, en pastas y polvos, ya que tiene un mejor efecto solvente que el bencen sulfonato de tetrapropileno. Puede ser usado solo o en combinación con otras sustancias detergentes |

En cuanto a los componentes químicos presentes en el producto comercial se encuentran en la Tabla 7.2.

Tabla 7.2 Porcentajes de los componentes presentes de la sustancia activa comercial

| | |
|-----------------------------------|------|
| % activo | 80.0 |
| % Na ₂ SO ₄ | 15.8 |
| % NaCl | 1.7 |
| % Humedad | 1.0 |
| pH sol. 1% | 7.01 |

Para el cumplimiento de los objetivos se generaron en el interior del BIODISCO biopelículas en la *primera y tercera etapas* del sistema.

Por otro lado el material y equipo de laboratorio utilizados en el presente estudio comprendieron básicamente el respirómetro Warburg, los reactivos y el material requeridos para montar la técnica de sustancias activas al azul de metileno (SAAM) para la obtención de los rangos óptimos de concentraciones de detergentes para la experimentación.

7.2 Generación de la biopelícula

Como se analizó, en el capítulo 3, cada una de las etapas se encargan de degradar sustratos diferentes debido a las diferentes comunidades que tienen cada una.

De esta manera, además de la accesibilidad y para tener un marco comparativo del proceso, tanto en la *primera* como en la *tercera etapa*, sobre el empaque que forman los discos de polietileno, se colocaron soportes de nylamid, en los cuales se pusieron discos de vidrio esmerilado de 10 cms de diámetro con 3 mm de espesor y un barreno central de 1 cm.

Como se vió en el capítulo de biopelícula, el crecimiento de ella depende de una serie de factores físicos, químicos y ambientales que ya se han discutido con anterioridad.

El estudio dió inicio a principios de junio, época con frecuentes lluvias y elevadas temperaturas, las cuales oscilaron entre 20 y 25 °C en promedio, por lo que el tiempo de formación se vió afectado de manera sustancial.

En cuanto a la biopelícula de la *primera etapa*; etapa de eliminación de material carbonoso, su tiempo de formación varía entre 3 a 5 días.

Una película de la *primera etapa* en óptimas condiciones tiene un color grisáceo y crecimiento uniforme. Dado el grado de concentración de nutrientes, es frecuente ver dentro de la biopelícula pequeños trozos de madera, ramas o basura, que es importante eliminar para la elaboración de los trabajos cinéticos.

Ya que esta etapa recibe la mayor concentración de nutrientes, su crecimiento es acelerado, por lo que hay que tomar las medidas necesarias para no tener un exceso de grosor que pueda interferir en el estudio.

Es sabido que a medida que se incrementa el número de etapas, las poblaciones son cada vez más selectivas y su crecimiento depende del establecimiento de otras poblaciones que les sirven de hospederas, tal es el caso de las bacterias nitrificantes. A la vez que se hacen más sensibles a los cambios ambientales.

La biopelícula de la *tercera etapa* tarda en establecerse en un periodo entre 3 semanas a 1 ó 2 meses dependiendo, en mucho, de las condiciones ambientales y la calidad del agua, por lo que es importante tomar en cuenta este periodo en el diseño experimental.

El color de la biopelícula de la *tercera etapa* es café cobrizo se podría incluso decir que rojizo, son mucho más delgadas y su crecimiento es sumamente lento, además de ser susceptibles a predadores naturales del sistema, principalmente como: protozoarios, crustáceos y oligoquetos; estos dos últimos grupos pueden constituir un serio problema para la uniformidad de la biopelícula e incluso para su establecimiento.

7.3 Diseño del experimento

En cuanto al diseño experimental se dividió en tres partes:

Primera parte.- Biopelícula

Para la obtención de biopelículas óptimas para los trabajos de respirometría, se colocaron los soportes necesarios para la obtención de corridas suficientes, desfasando su crecimiento por un día.

De esta manera se colocaron 5 corridas sucesivas para la primera etapa y tres corridas sucesivas para la tercera etapa.

Segunda parte.- Análisis exploratorio sobre SAAM

Mientras la biopelícula era generada en cada etapa a estudiar del biodisco; por otro lado, se daba inicio a los análisis de concentración de detergentes.

En las instalaciones del Instituto de Ingeniería se llevó a cabo la técnica de SAAM para determinar concentraciones de detergentes por colorimetría (APHA, 1985).

Se llevó a cabo un análisis de las aguas residuales a tratar, escogiendo, dado las curvas de comportamiento de los caudales, la hora pico de 12:00 a 13:00 hrs cuando las aguas residuales afluyen a la planta con una mayor concentración de nutrientes.

Para este análisis exploratorio y por ser considerados puntos decisivos en el sistema de tratamiento se eligieron los siguientes puntos de muestreo:

- 1) Inicio del tren de tratamiento, criba
- 2) Parshall
- 3) Primera etapa
- 4) Tercera etapa.

La toma de muestras fué cada 10 minutos, en cada uno de los puntos escogidos

Los resultados de este análisis preliminar se puede apreciar en la Tabla 7.3.

TABLA 7.3 Resultados del análisis exploratorio de las aguas de estudio, concentraciones de alquil aril sulfonato de sodio

| | | |
|----------------------|----------------|--------|
| CRIBA | 8.181 - 14.329 | 10.652 |
| PARSHALL | 9.567 - 10.110 | 9.838 |
| PRIMERA ETAPA | 5.227 - 7.759 | 6.565 |
| TERCERA ETAPA | 4.504 - 6.373 | 5.408 |

Preparación de reactivos

Una vez teniendo el comportamiento del tensoactivo dentro del proceso de tratamiento, se establecieron las diferentes concentraciones que se utilizaron en las corridas experimentales.

a) Concentraciones utilizadas de AAS al 100 por ciento

Primera etapa:

Límite máximo 6.5 mg/l

Concentraciones utilizadas:

- 1.5 mg/l
- 3.0 mg/l
- 4.5 mg /l
- 6.0 mg/l

Tercera etapa:

Límite máximo 3.0 mg/l

Concentraciones utilizadas:

- 1.0 mg/l
- 1.5 mg/l
- 3.0 mg/l

Aunque el límite máximo que se encontró para la tercera etapa es mucho más elevado al efectuarse las corridas de prueba se demostró que la biopelícula de la tercera etapa es mucho más sensible de lo que se creía por lo que este rango tuvo que ser minimizado.

b) Solución buffer de fosfatos

Dada la información recopilada en el capítulo de biopelícula sobre parámetros óptimos de crecimiento, se preparó esta solución para obtener un buffer con $\text{pH} = 7.2 \pm 0.1$

Tercera parte: Respirometría

El procedimiento experimental será el descrito por Nava, C. (1992), quien implementa el método de respirometría desarrollado por Warburg para realizar estudios de cinética enzimática en películas biológicas.

Preparación de la biopelícula

La biopelícula es trasladada a las instalaciones de laboratorio y se procede con el tratamiento preliminar de la misma.

Dicha muestra fué enjuagada durante una hora en solución buffer de fosfatos para la eliminación de contaminantes y exceso de sustrato con el fin de eliminar errores experimentales que puedan influir en los resultados de respirometría.

Respirometría

Posteriormente fué trasladada a condiciones controladas de pH y temperatura en el laboratorio, siendo las condiciones de operación las siguientes: una temperatura constante de 21°C , controlada mediante el termostato y el sistema refrigerante del respirómetro Warburg; y un pH de 7.1 ± 0.1 mediante el buffer de fosfatos, el pH utilizado debe ser el pH final cuando la biopelícula ya se encuentra integrada al sistema.

Se reguló la velocidad a la cual el sistema de tracción magnética hará girar a las biopelículas en el interior de las cámaras de reacción, esta velocidad fué de 7 r.p.m. simulando la velocidad de rotación del biodisco.

Una vez controlado el pH, la temperatura y las r.p.m; se procede a la colocación de las hojuelas de hidróxido de sodio en su respectivo contenedor, y se procede a cerrar cada una de las cámaras de reacción.

Una vez verificado el sistema se conectan las cámaras de reacción a los manómetros correspondientes.

Finalmente se añade el sustrato de estudio por la entrada respectiva y se cierra inmediatamente el sistema para iniciar el registro de los datos del manómetro.

Las lecturas se obtuvieron directas del manómetro cada 5 minutos durante aproximadamente 4 horas éstas formarán el conjunto de datos al final de cada corrida experimental. Cabe aclarar que el tiempo de corrida experimental variará de acuerdo al sustrato y biopelícula utilizada.

7.4 Obtención de los valores de la respiración

El consumo de oxígeno fue calculado por la caída de la presión, medida a través del manómetro. Cuando existe consumo de oxígeno, el oxígeno atmosférico de la cámara de reacción se disuelve en el líquido, disminuyendo la presión, la cual se registra en el manómetro.

Los valores de consumo de oxígeno (CO) se obtuvieron a partir de la siguiente ecuación:

$$CO \text{ (mgO}_2\text{/l)} = h(k) \quad \dots(1)$$

Donde:

- CO = Consumo de oxígeno
- h = Diferencia de presión (mm)
- k = Constante de cada cámara de reacción

Si

$$k = 0.143 \left[V_g \left(\frac{273}{T} \right) + V_f \alpha \right] \frac{1}{V_r} \quad \dots(1.1)$$

V_g = Volumen del gas del manómetro hasta la marca de referencia, se le resta el volumen de: la solución de sustrato + disco + flecha

T = Temperatura (°K)

V_f = Volumen de la solución de potasio + sustrato + suspensión de microorganismos (ml)

α = Coeficiente de difusión de oxígeno a la temperatura de la experimentación

V_r = Volumen del sustrato + la suspensión de los microorganismos

y

$$V_r = V_f \quad \dots(1.2)$$

Entonces

$$k = 0.143 \left[\left(\frac{V_g}{V_r} \right) \left(\frac{273}{T} \right) + \alpha \right] \quad \dots(1.3)$$

Esta constante, ecuación (1.3), es única e independiente para cada cámara de reacción.

7.5 Análisis de tendencia matemática

Dado el comportamiento de los datos, antes de efectuar cálculos definitivos se realizarán análisis exploratorios en cada una de las corridas, en búsqueda de un modelo matemático que se ajuste lo más posible a las observaciones experimentales sin desviarse de su comportamiento original.

Para tal objetivo se probaron cuatro diferentes métodos: uno de ellos consta en la aplicación de un paquete computacional sofisticado y los tres restantes se refieren a métodos matemáticos y estadísticos.

Todos los métodos fueron probados con las corridas experimentales tanto de la primera como de la tercera etapa.

Función de Lagrange, paquete computacional MATHEMATICA®

Dentro de los métodos existentes se eligió el de **La fórmula de Lagrange** aplicada a interpolación de puntos equidistantes, (existe una fórmula general de este método para puntos separados arbitrariamente).

La fórmula de Lagrange obtiene un polinomio de grado n cuando se aplica a (n + 1) puntos.

La fórmula para encontrar un polinomio de Ln(x) es la siguiente:

$$Ln(x) = \sum_{i=0}^n y_i \frac{(x-x_0)(x-x_1)\dots(x-x_{i-1})(x-x_{i+1})\dots(x-x_n)}{(x_i-x_0)(x_i-x_1)\dots(x_i-x_{i-1})(x_i-x_{i+1})\dots(x_i-x_n)}$$

Donde

x_i = son las abscisas de los datos
 y_i = son las ordenadas

Con esta fórmula y la ayuda del paquete Mathematica®, donde es posible trabajar álgebra formal, se encontraran las funciones de los datos (Demidovich, B. y Maron, I., 1976).

Modelo bioestadístico EXPONENCIAL

Bajo condiciones, donde el consumo de sustrato no está ligado a factores del ambiente, es factible utilizar el método exponencial cuya función se define:

$$CBO_t = CBO_0 e^{kt}$$

Esta función indica que a partir de una concentración inicial (CBO₀), después de t tiempo, la velocidad de consumo estará dada por el producto de dicha concentración por el exponencial del producto de la tasa intrínseca de consumo en un lapso de tiempo t transcurrido.

Modelo bioestadístico LOGÍSTICO

Cuando se tiene un comportamiento en el cual existe un límite máximo de consumo (rapidez máxima de reacción), el cual depende del metabolismo de la población, y éste valor gráficamente tiende a ser asintótico. El modelo que representa dicho comportamiento se denomina *modelo logístico* cuya ecuación es:

$$CBO_t = \frac{k}{1 + e^{a-rt}}$$

Donde:

- CBO_t = es el CBO en el tiempo t
- K = velocidad máxima alcanzada o capacidad de carga
- a = CBO en el tiempo cero
- r = tasa instantánea de consumo
- t = tiempo
- e = base de los logaritmos naturales

Modelo estadístico POLINOMIAL

El principal problema que se enfrenta, es encontrar una curva de ajuste que cumpla con los objetivos de cálculo: el ajuste desde cero de los primeros puntos y la tendencia a una velocidad máxima permanente.

Buscando la mejor curva de ajuste y evitando el juicio individual en la generación de ecuaciones, se encontró que la técnica estadística que contempla el cálculo de la bondad de ajuste, minimizando el error y que genera una gran variedad de posibilidades es *el ajuste por mínimos cuadrados*, este método será analizado (Murray, R.S., 1982).

El polinomio de aproximación por mínimos cuadrados a la serie de puntos $(x_1, y_1); (x_2, y_2); \dots; (x_n, y_n)$ tiene la ecuación:

$$y = a_0 + a_1X + a_2X^2$$

Dado que la función que se busca debe partir desde cero, la función queda finalmente:

$$y = a_1x + a_2x^2$$

La determinación de las constantes cinéticas: velocidad máxima de degradación y constante de Henri-Michaelis-Menten, serán calculadas por el método gráfico de Lineaweaver y Burk.

7.6 Método gráfico de Lineweaver y Burk

Este método se fundamenta en la teoría de cinética enzimática de Henri-Michaelis-Menten, donde se combina de origen dos ordenes de reacción, por el comportamiento químico y la explicación matemática que esto involucra, en dicha ecuación se establece una reacción de primer orden en la parte inicial, donde la rapidez de consumo es proporcional al sustrato, lo cual se determina linealmente. Bajo esta premisa el método gráfico de Lineweaver y Burk se define conjuntamente con el siguiente razonamiento:

Despejando a V de la ecuación de Henri-Michaelis-Menten

$$v = \frac{[S]V_{max}}{K_m + [S]}$$

Aplicando los recíprocos a ambos miembros de la ecuación se tiene:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m + [S]}{V_{max}[S]}$$

Simplificando y separando los términos, la ecuación nos queda:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} \left(\frac{1}{[S]} \right) + \frac{1}{V_{max}} \quad \dots(2)$$

Esta ecuación corresponde a la de una recta

$$y = ax + b$$

Donde

- y** = $1/V$, *velocidad a una concentración de sustrato x*
x = $1/[s]$, *inverso de la concentración*
a = *la pendiente de la recta k_m / V_{max}*
b = *ordenada al origen, $1 / V_{max}$ inverso de la velocidad máxima.*

Así de una manera indirecta, despejando (2) se puede encontrar los valores de K_m y V_{max} .

8 RESULTADOS

Considerando que el paso que controla la rapidez del proceso degradativo es la reacción enzimática, y que este proceso puede describirse por medio de la *Teoría de Henri, Michaelis y Menten*, es factible obtener las constantes cinéticas de degradación a través de este método.

8.1 Resultados experimentales

Para agilizar la generación de los datos, se elaboró un programa computacional que obtiene los valores numéricos de la respiración total y la respiración neta; así como su respectiva graficación.

Retomando la ecuación (1) del capítulo 7 y con la constante respectiva de cada cámara de reacción, se obtuvieron los valores de la respiración tomando en cuenta las siguientes consideraciones:

$$CO \text{ (mgO}_2\text{/l)} = h(k) \quad \dots(1)$$

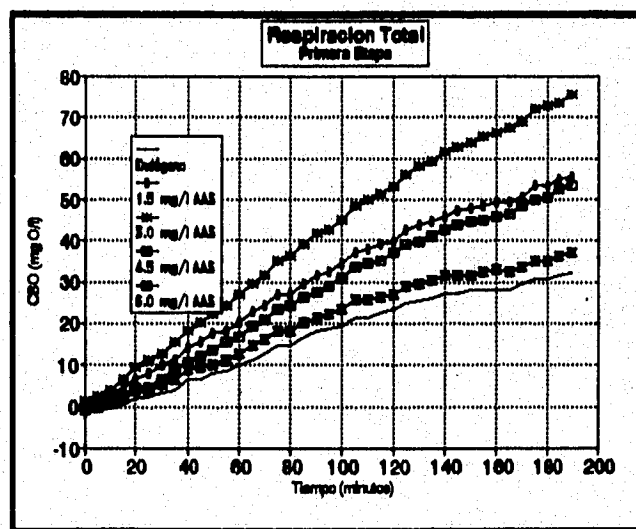
Respiración Total = respiración endógena + respiración exógena

Respiración Neta = respiración total - respiración endógena

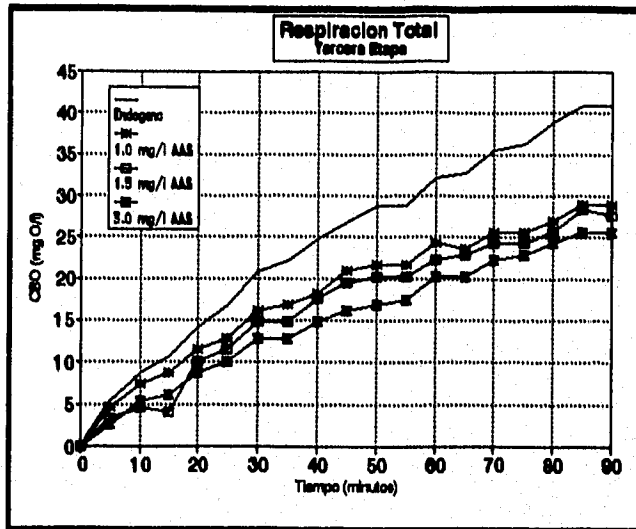
Todos estos términos ya se han definido en el capítulo de cinética y las tablas con los resultados de los cálculos para ambas respiraciones se encuentran en el apéndice A.

8.2 Graficación de los resultados experimentales

Como es natural las curvas obtenidas experimentalmente contienen algunas irregularidades debido a que el método experimental es sumamente sensible a variaciones de temperatura y presión atmosférica. La obtención de gráficas uniformes es complicada, muestran las condiciones experimentales en que se efectuó la investigación. Así que se efectuaron varias pruebas hasta obtener los siguientes resultados:



Gráfica 8.1 Consumo bioquímico de oxígeno para la primera etapa



Gráfica 8.2 Consumo bioquímica de oxígeno para la tercera etapa

Nótese la ubicación de la respiración endógena en cada etapa. Se observa que mientras que en la primera etapa se ubica por debajo de las demás concentraciones, para la tercera etapa, ésta se encuentra por encima de las concentraciones experimentales, lo que refleja el grado de agresividad del tensoactivo con respecto a las poblaciones que componen la biopelícula en cada una de las etapas.

8.3 Análisis de ajuste matemático

Función de Lagrange, paquete computacional MATHEMATICA®

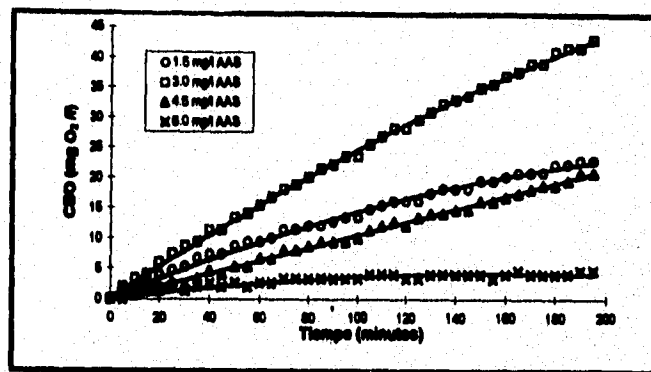
Debido a que un método de interpolación trata de ajustar la función a todos los puntos dados y debido a su exigida precisión, se obtuvieron funciones con muchos cambios de pendiente y divergencia de la función en los extremos (Demidovich, B. y Maron, I., 1976). Esto por supuesto, hace imposible alcanzar los objetivos planteados, dado que es necesario obtener un ajuste óptimo en la parte inicial de la curva; además de apreciar el momento de alcance de la velocidad máxima de reacción, por lo tanto este método no fue seleccionado.

Tanto el *modelo bioestadístico EXPONENCIAL* como el *LOGÍSTICO* reflejaron una gran divergencia de los datos originales.

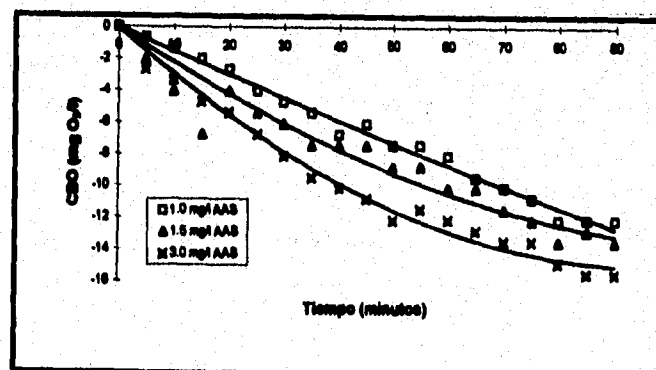
Los métodos hasta ahora expuestos arrojan funciones de grado superior que aumentan en complejidad, no tienen una justificación estadística óptima y se salen del comportamiento esperado, por lo que no fueron seleccionados para los cálculos posteriores.

8.3.1 Ajuste polinomial por mínimos cuadrados

Este método se analizó, comprobándose que se ajusta a los objetivos experimentales y estadísticos planteados (Murray, R., 1982); y ya que el objetivo recae en el comportamiento específico de la biopelícula en las condiciones experimentales; el ajuste y el análisis matemático posterior se efectuó sobre los datos obtenidos a partir de la respiración neta.



Gráfica 8.3 Comparación entre las observaciones experimentales y la curva de ajuste, Primera Etapa



Gráfica 8.4 Comparación entre las observaciones experimentales y la curva de ajuste, Tercera Etapa

Como se puede ver en las Gráficas 8.3 y 8.4 los datos experimentales y la curva de ajuste tienen la misma tendencia y dadas las ventajas estadísticas de su generación (ver Tabla 8.1), además de su acoplamiento a la teoría de Henri-Michaelis-Menten, este modelo fue seleccionado para continuar con los cálculos cinéticos.

Tabla 8.1 Coeficientes de la ecuación de ajuste y coeficientes de correlación obtenidas para cada curva

| $y = \theta_1 x + \theta_2 x^2$ | | | |
|---------------------------------|------------|------------|--------|
| [mg./l AAS] | θ_1 | θ_2 | r^2 |
| 1.5 | 0.2759 | -0.0003 | 0.9989 |
| 3.0 | 0.1748 | -0.0033 | 0.9945 |
| 4.5 | 0.1049 | -1E-05 | 0.9958 |
| 6.0 | 0.0537 | -0.0002 | 0.9009 |
| $y = \theta_1 x + \theta_2 x^2$ | | | |
| [mg./l AAS] | θ_1 | θ_2 | r^2 |
| 1.0 | -0.1535 | 0.001 | 0.9896 |
| 1.5 | -0.2311 | 0.0009 | 0.9197 |
| 3.0 | -0.3094 | 0.0016 | 0.9853 |

Como se puede observar, en ambos casos, y sin hacer un análisis cinético previo de los mismos, cuanto más aumenta la concentración de tensoactivo mayor es el efecto de disminución en la rapidez de la respiración, esto se puede observar claramente en las pendientes que presentan cada una las curvas ajustadas.

Como se mencionó con anterioridad, en la gráfica 8.1 que corresponde a los datos de la respiración total de la primera etapa, la respiración endógena se presenta por debajo de las concentraciones experimentales, lo cual refleja un comportamiento normal hasta cierto punto. En la respiración neta para la misma etapa (gráfica 8.3), el efecto del tensoactivo es adverso para la rapidez de degradación, aunque con la clara tendencia a una recuperación; en la misma gráfica se observa que a partir del minuto 20,

todas las biopelículas expuestas tienden a una recuperación constante y ascendente a excepción de la concentración máxima, ésto por razones obvias; por otro lado, contrario a lo que se espera la concentración de 3.0 mg/l de AAS parece estimular la respiración al contrario de las demás concentraciones y más aún para la concentración de 1.5 mg/l de AAS que a pesar de ser menor parece ser más tóxica que la de 3.0 mg/l, ésto viene a reforzar la teoría de la sensibilidad de la biopelícula a concentraciones pequeñas intermitentes que a concentraciones altas pero permanentes y, que los primeros segundos de la reacción enzimática no son tan determinantes en el caso de los tensoactivos como se piensa, ya que según las gráficas correspondientes, la biopelícula se recupera después de los primeros segundos críticos. Ahora bien, en cuanto al comportamiento para la concentración de 3.0 mg/l de AAS éste depende de la población específica que se encuentre en contacto con la biopelícula en ese momento, la cual tiene una mayor adaptabilidad y resistencia a los agentes tóxicos que se encuentran en el medio.

Sin embargo, ésto no ocurre en la tercera etapa, donde se observa desde la gráfica 8.2 que corresponde a la respiración total, que la respiración endógena se encuentra por encima de las concentraciones experimentales lo cual refleja un efecto negativo que sobrepasa el nivel de reserva de la propia biopelícula, y este efecto tóxico tan severo se puede apreciar en la gráfica 8.4 como se va agudizando conforme aumenta la concentración sin ninguna posibilidad de recuperación.

8.4 Cinética de degradación

A continuación se definirá el efecto del tensoactivo cuantitativamente, para poder determinar el grado de afectación, basándonos en la teoría de Henri-Michaelis-Menten.

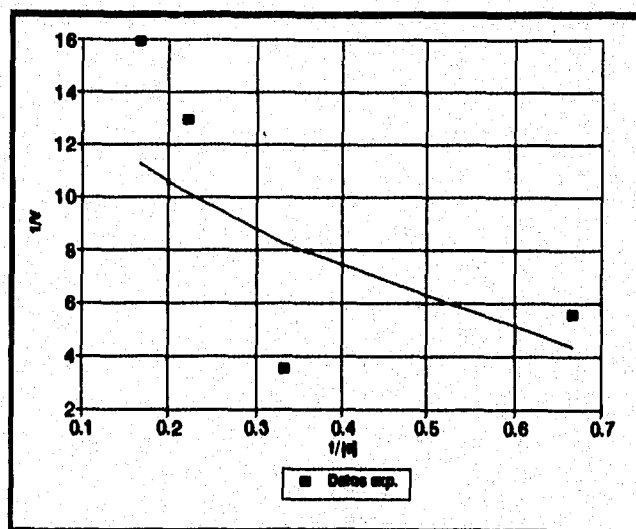
8.4.1 Tendencia cinética

Continuando con el análisis y de una manera general, se puede definir el comportamiento de las curvas obtenidas.

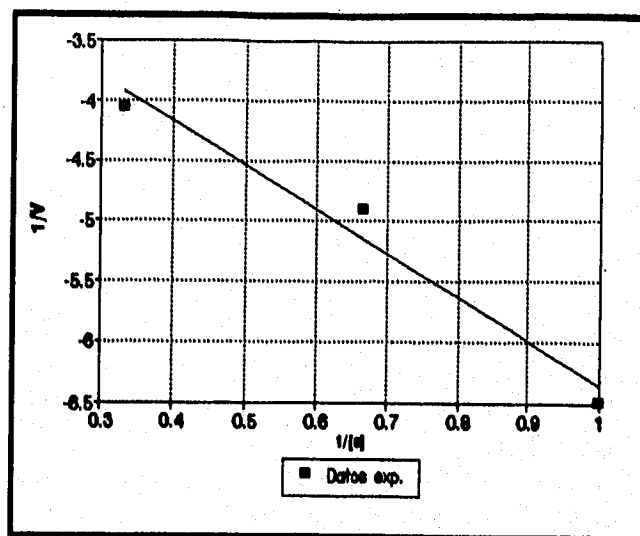
Un método simplificado para la obtención de los coeficientes cinéticos que involucra el modelo cinético de Henri-Michaelis-Menten, es el método de linealización de *Lineweaver y Burk*.

Para los objetivos planteados, cada curva experimental corresponde a una concentración de sustrato y cada curva tiene una velocidad inicial promedio. Las velocidades iniciales para cada concentración utilizada, se calcularon por medio de una regresión lineal. Con este valor y la concentración correspondiente de cada sustrato, se continuó con la graficación de los inversos de estos valores, gráfico conocido como *doble inversa o linealización de Lineweaver y Burk*.

Las Gráficas 8.5 y 8.6 muestran que tienen la misma tendencia cinética, una clara disminución en la velocidad de reacción.



Gráfica 8.5 Curva de tendencia cinética, primera etapa



Gráfica 8.6 Curva de tendencia cinética, tercera etapa

Mediante estos gráficos se confirman las anteriores observaciones; en la gráfica 8.5 la tendencia hacia una disminución en la rapidez de la reacción, es clara aunque con altas probabilidades de recuperarse ya que la curva no es muy pronunciada y se mantiene en un rango de valores positivos, incluso para la última concentración.

La gráfica 8.6 viene a reforzar la explicación de los resultados de la gráfica 8.4 en cuanto a la tendencia en la tercera etapa; aquí se puede observar claramente que desde la primera concentración la biopelícula se ve afectada severamente a medida que aumenta la concentración, éste efecto altamente nocivo se refleja en el rango negativo en que se mantiene y que viene a confirmar las nulas posibilidades de recuperación.

Es sabido que cualquier sustancia que reduzca la velocidad de una reacción catalizada enzimáticamente se considera como un *inhibidor*, por lo tanto se tiene un esquema clásico de *inhibición enzimática* para ambos casos.

Antes de proceder con la identificación del tipo de inhibición y los resultados del cálculo de las constantes cinéticas, se dará una breve introducción al tema de *inhibición enzimática*.

8.5 Inhibición enzimática

La inhibición de la actividad enzimática es uno de los mecanismos de regulación más importantes de las células vivas. Considerando, que un gran número de compuestos pueden convivir con ciertas enzimas sin actuar como sustratos es de esperarse que exista una gran variedad de modalidades de afectación que bloqueen la actividad catalítica de la enzima, estas sustancias no actúan de igual manera; hasta ahora se conocen algunos tipos de Inhibición, los cuales se mencionarán brevemente a continuación.

8.5.1 Tipos de inhibición enzimática

Inhibición Competitiva

La velocidad máxima no se afecta por un inhibidor competitivo pero el valor de K_m aparentemente aumenta.

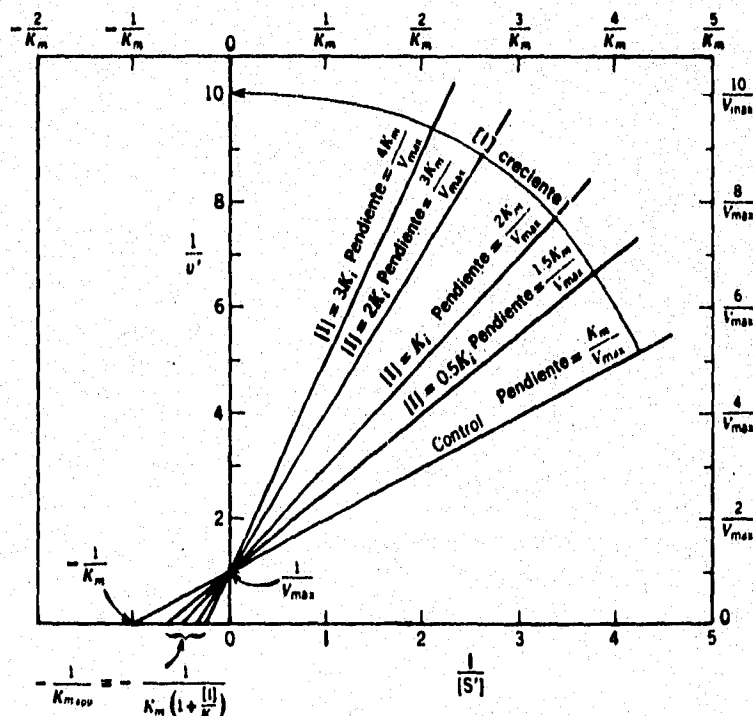


Figura 8.1 Representación de $1/v$ frente a $1/[S]$ en presencia de diferentes concentraciones fijas de un inhibidor competitivo

Inhibición No Competitiva

Un inhibidor no competitivo clásico no tiene ningún efecto sobre la unión al sustrato y viceversa. Sustrato e inhibidor se unen reversiblemente, al azar e independientemente en diferentes sitios. El único efecto de un inhibidor no competitivo es disminuir V_{max} .

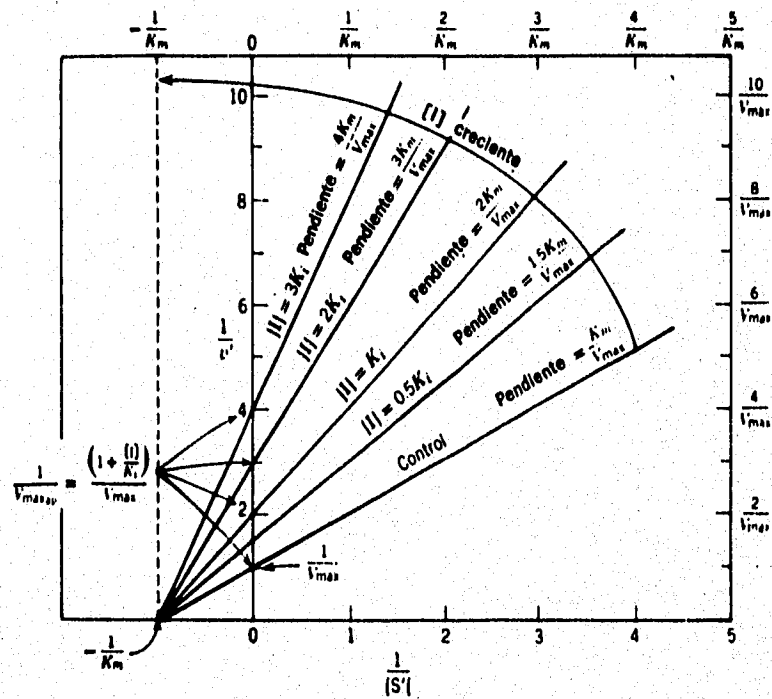


Figura 8.2 Representación de $1/v$ frente a $1/[S]$ en presencia de diferentes concentraciones fijas de un inhibidor no competitivo

Inhibición Irreversible

Una sustancia que se combina irreversiblemente con una enzima puede parecerse a un inhibidor no competitivo debido a que V_{max} disminuye pero K_m no varía.

Inhibición Acompetitiva

Un inhibidor acompetitivo es un compuesto que se une reversiblemente al complejo enzima-sustrato, dando un complejo inactivo ESI. El inhibidor no se une al enzima libre.

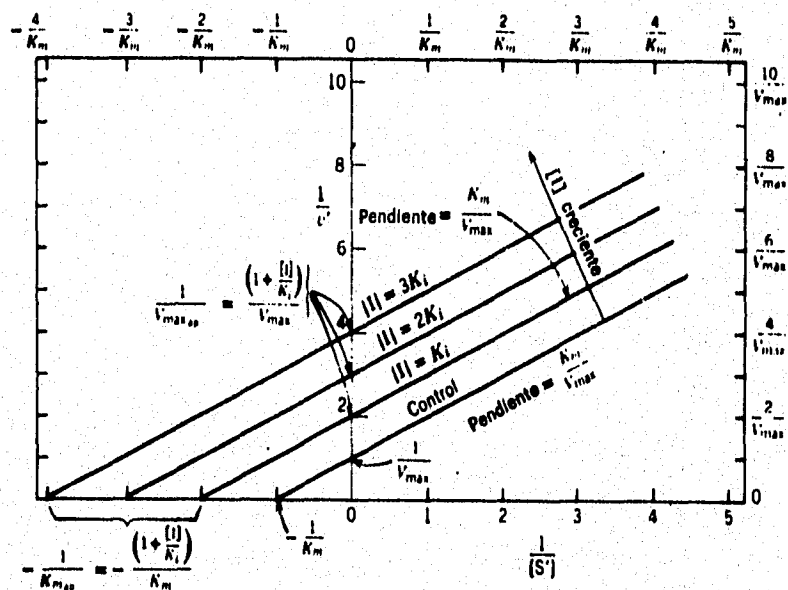


Figura 8.3 Representación de $1/v$ frente a $1/[S]$ en presencia de diferentes concentraciones fijas de un inhibidor acompetitivo

Inhibición Lineal Tipo Mixto

En realidad se trata de una forma de inhibición no competitiva en el cual se forma un complejo ESI ya sea por vía $EI + S$ ó $ES + I$, en donde el complejo ESI es un complejo inactivo.

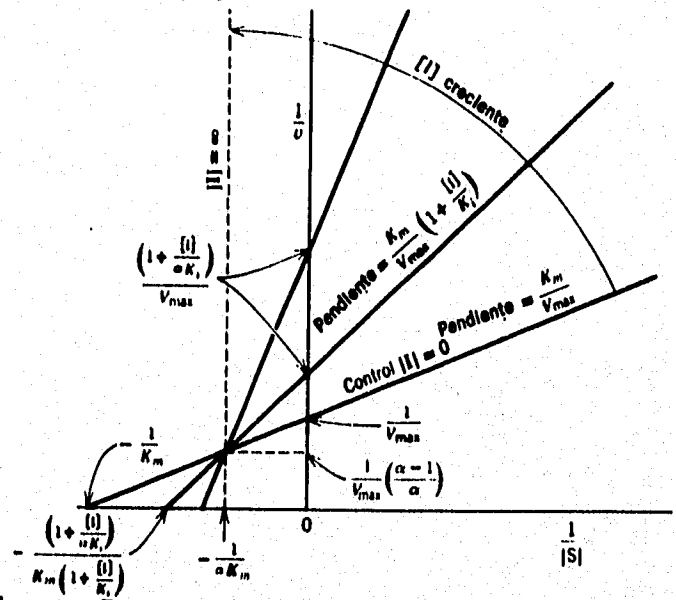


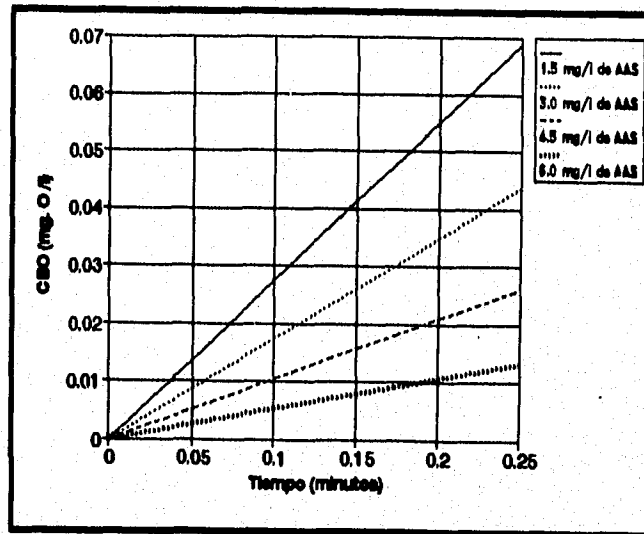
Figura 8.4 Representación de $1/v$ frente a $1/[s]$ en presencia de diferentes concentraciones fijas de un inhibidor mixto ($1 < \alpha < \infty$)

8.5.2 Determinación del tipo de inhibición

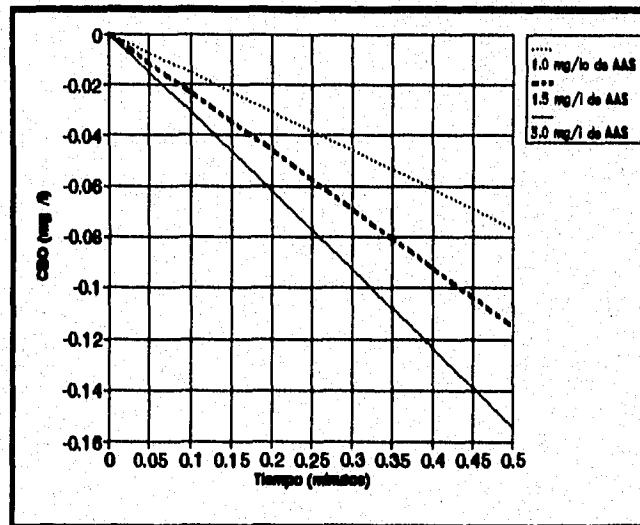
Otra de las ventajas del método gráfico de Lineweaver y Burk es que a través de éste también se puede determinar el tipo de inhibición. Si se procede a un análisis formal, conociendo la ecuación de consumo bioquímico de oxígeno (ajuste polinomial) y a través de su derivada, se conocerá la rapidez instantánea para un punto n en un tiempo n , por lo tanto se puede obtener tanto la concentración de sustrato consumido, como la rapidez instantánea para un punto cualquiera en cada condición experimental estudiada.

| | |
|---------------------|--------------------|
| Concentración | Velocidad |
| $y = a_1x + a_2x^2$ | $y' = a_1 + 2a_2x$ |

De esta manera, mediante las ecuaciones del modelo de ajuste y la derivada, se obtuvieron las concentraciones de sustrato consumido y la rapidez de reacción para tiempos iniciales cortos (ver gráficas 8.7 y 8.8).



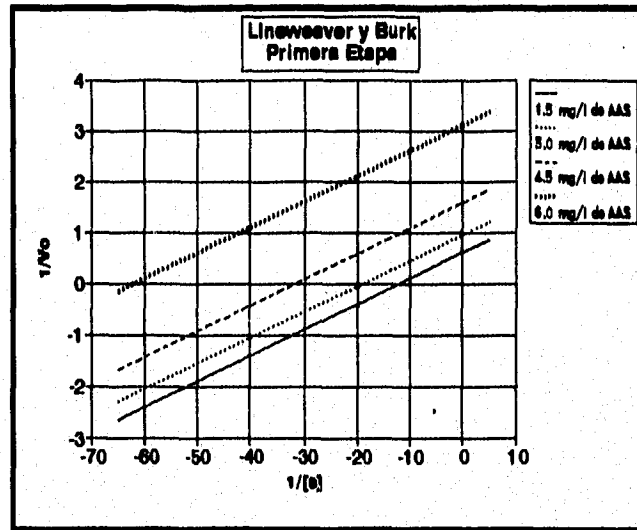
Gráfica 8.7 Corrida experimental de la primera etapa, Respiración Neta Ajustada



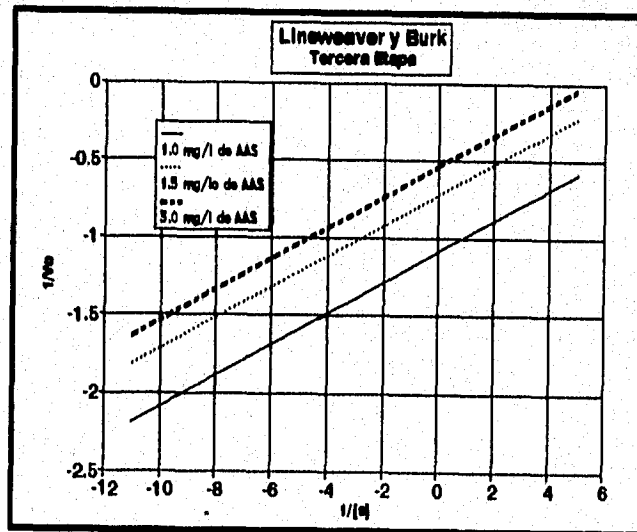
Gráfica 8.8 Corrida experimental de la tercera etapa, Respiración Neta Ajustada

De acuerdo con Segel (1982) la ecuación de Henri-Michaelis-Menten solo es válida solo si la velocidad se mide en un tiempo lo suficientemente corto para que la concentración de sustrato se mantenga constante para ello es necesario que no reaccione más del 5 por ciento del sustrato, por lo que se

procedió a afinar los primeros puntos; a los cuales se les aplicó el método de linearización, graficándose los dobles inversos, obteniendo finalmente los gráficos conjuntos.



Gráfica 8.9 Tipo de inhibición, Primera Etapa

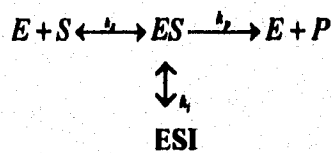


Gráfica 8.10 Tipo de inhibición, Tercera Etapa

Conforme a lo expuesto en las figuras 8.1, 8.2, 8.3, y 8.4 donde se muestran los gráficos correspondientes a cada tipo de inhibición, esta investigación de acuerdo al método de linearización corresponde a una inhibición de tipo **acompetitiva para ambos casos**.

La inhibición acompetitiva es común en sistemas multireactivos (Segel, H. I., 1982), observando las condiciones de la biopelícula, éstas incluyen una gran diversidad de poblaciones involucradas en los procesos de degradación de sustratos, en este caso aguas residuales, lo cual incluye una variedad de complejos multienzimáticos y multireactivos, por lo tanto es perfectamente posible que se presente para estos sistemas biológicos una inhibición de este tipo.

Un inhibidor acompetitivo clásico es un compuesto que se une reversiblemente al complejo enzima-sustrato, dando un complejo inactivo **ESI**. Cabe resaltar que el inhibidor no se une a la enzima libre, sino que es una adición secuencial de dos ligandos enzimáticos en un orden obligado, es decir, el inhibidor acompetitivo no se une al sustrato si la enzima no lo ha hecho antes (aunque rara vez lo hace a un complejo central donde los sitios de unión ya han sido ocupados). La secuencia de la reacción es la siguiente:



Por el esquema anterior se puede ver que para cualquier concentración de inhibidor, una concentración de sustrato infinitamente alta, no hará que todo el enzima pase a ES, siempre habrá una fracción en forma del complejo no productivo ESI. Por lo tanto la V_{max} en presencia de un inhibidor acompetitivo (V_{max_i}) será menor que V_{max} en ausencia de inhibidor; por otro lado la K_m aparente también disminuye, ya que $ES + I \rightleftharpoons ESI$ que utiliza ES obligando que la reacción se desplace hacia la derecha.

En resumen, un inhibidor acompetitivo hace disminuir a V_{max} y a K_m en igual proporción.

La ecuación que describe este comportamiento es:

$$\frac{v}{V_{max}} = \frac{[S]}{k_m \left(1 + \frac{[I]}{k_i}\right) + [S]} \quad \dots(4)$$

donde $V_{max_i} = \frac{V_{max}}{\left(1 + \frac{[I]}{k_i}\right)}$ = a V_{max} aparente a la [I] dada

y $K_{m_{ap}} = \frac{K_m}{\left(1 + \frac{[I]}{k_i}\right)}$ = la K_m aparente a la misma [I] dada

8.5.3 Constantes cinéticas

La expresión matemática del método de Lineweaver y Burk para la inhibición acompetitiva es:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)$$

La pendiente sigue siendo K_m/V_{max} pero la intersección con $1/v$ aumenta en $\left(1 + ([I]/K_i)\right)$, factor que si regresando a la ecuación original (ecuación 4) también multiplica a la [s], por lo tanto, las rectas de *más inhibidor* son paralelas.

De esta manera, a medida que la [I] aumenta, la intersección con el eje $1/v$ aumenta, formando un conjunto de rectas paralelas.

Para finalizar con el método, y obtener las constantes cinéticas, se obtuvieron los valores de las intersecciones con los ejes, se aplicaron los inversos y se obtuvieron los valores de las constantes cinéticas aparentes, que se encuentran resumidos en la Tabla 8.2.

Tabla 8.2 Resumen de las constantes cinéticas aparentes obtenidas

| | |
|---------------------|---------------------|
| $V_{max_{pp\ 1.5}}$ | 1.65504 |
| $V_{max_{pp\ 3.0}}$ | 1.04843 |
| $V_{max_{pp\ 4.5}}$ | 0.62938 |
| $V_{max_{pp\ 6.0}}$ | 0.32195 |
| $Km_{pp\ 1.5}$ | 0.082758 mg AAS/l |
| $Km_{pp\ 3.0}$ | 0.052428 mg AAS/l |
| $Km_{pp\ 4.5}$ | 0.031469 mg AAS/l |
| $Km_{pp\ 6.0}$ | 0.016102 mg AAS/l |
| $V_{max_{pp\ 1.0}}$ | -0.9185997 |
| $V_{max_{pp\ 1.5}}$ | -1.3844399 |
| $V_{max_{pp\ 3.0}}$ | -1.8525597 |
| $Km_{pp\ 1.0}$ | 0.09193992 mg AAS/l |
| $Km_{pp\ 1.5}$ | 0.13851596 mg AAS/l |
| $Km_{pp\ 3.0}$ | 0.18538390 mg AAS/l |

Ya se ha visto que los gráficos de inhibición correspondieron a una inhibición acompetitiva la cual está perfectamente representada por la gráfica 8.9 que corresponde a la primera etapa. En esta gráfica se corrobora el comportamiento de un inhibidor acompetitivo; donde una parte del [ES] se está uniendo con el inhibidor formando el [ESI] inactivo, lo que induce a la disminución de la rapidez de reacción (tabla 8.2). La formación de este complejo disminuye la probabilidad de formación de E+P lo que provoca un retraso de los siguientes procesos metabólicos de eliminación, ya que solo se adhiere y no permite su degradación, como el inhibidor actuó de igual manera en el sustrato origina una variación proporcional tanto en V_{max} como en Km formando líneas paralelas. El grado de

inhibición es considerable, sin embargo aún así se sigue formando producto el cual está representado por los valores positivos, por lo tanto las concentraciones experimentales todavía dan oportunidad de que se lleve a cabo la respiración y las poblaciones microbianas tengan oportunidad de recuperarse.

Para la tercera etapa, el grado de inhibición es sumamente serio como se puede apreciar en la gráfica 8.10 el comportamiento sigue siendo el mismo, pero los valores de consumo son negativos, lo que significa que no hay formación de producto; en realidad lo que se está gráficamente es la rapidez de formación de [ESI], analizando los valores de V_{max} de la tabla 8.2 efectivamente se trata de una inhibición incompetitiva pero de grado mayor donde todo el [ES] se está transformando en [ESI] inactivo, lo cual bloquea la formación de productos metabólicos al parecer de la totalidad de los microorganismos de la biopelícula, por lo que no permite ni la más leve formación de producto que permita una recuperación de la comunidad biológica, de esta manera al aumentar las concentraciones de inhibidor, aumenta la rapidez de bloqueo. Es necesario investigar que tan fuerte es esta unión electroquímica y que duración tiene para saber el grado de afectación ya que de acuerdo con la gráfica 8.2 este daño parece ser irreversible ya que la tendencia es al aceleramiento de la muerte de las poblaciones microbianas. De acuerdo a lo anterior se puede decir que las concentraciones experimentales sobrepasan los límites de recuperación de la biopelícula.

Para los valores obtenidos de k_m _{aparente} los cuales teóricamente representan el valor de la concentración necesaria de sustrato, en este caso de alquil aril sulfonato de sodio (AAS), para alcanzar 1/2 de la velocidad máxima de la reacción, esto implica que a menor valor de k_m mayor afinidad. De acuerdo con lo anterior, en la primera etapa, la cuarta concentración (6.0 mg/l de AAS) es la más afín al sistema enzimático; ya que tiene el valor de K_m menor, sin embargo, conforme se disminuye la cantidad de inhibidor la k_m aumenta; debido a que esta afinidad no repercute en la formación del producto, sino que bloquea al sistema enzimático, hace que a mayor concentración de AAS disminuya la cantidad de ES que continúe con las rutas cinéticas posteriores, esto hace disminuir la V_{max} por lo que se llega

más rápidamente a este valor. Si se efectúa la comparación con la k_m de la primera concentración (1.5 mg/l de AAS) se aprecia que la afinidad es menor, lo que significa que deja disponible mayor concentración de ES para que continúe con las rutas metabólicas ésto es claro puesto que la curva sigue ascendiendo a grado tal que la biopelícula puede seguir respirando, con dificultad ya que las velocidades disminuyen, pero no al grado de inhibirlas por completo, ésto se reafirma por los valores que se están analizando y desde el comportamiento de los datos originales de respiración neta de la primera etapa (gráfica 3). Hay que observar que las concentraciones experimentales fueron menores a las encontradas en las aguas residuales comunes.

En la tercera etapa para los valores de $k_{m,aparente}$ sucede el caso inverso numéricamente, pero el concepto sigue siendo el mismo, Por que la mayor afinidad se presenta en la menor concentración (1.0 mg/l de AAS) en la menor velocidad (considerando el valor absoluto de V_{max}), en realidad lo que sucede es que mientras en la primera etapa el sustrato que tenía la biopelícula es suficiente para continuar con sus procesos bioquímicos, en la tercera etapa la concentración de reserva de la propia biopelícula desde la primera concentración experimental no es la suficiente para mantenerse, por lo que el grado de inhibición se agudiza negativamente.

8.6 Mecanismo de acción y biopelícula

Los efectos fueron notorios en cada una de las etapas estudiadas. Como se ha visto, los tensoactivos naturales o sintéticos cambian la solubilidad y el estado físico-químico de los microconstituyentes en el agua influenciando su acumulación y dispersión en las fases vecinas.

El efecto en general de los detergentes es aumentar el poder emulsivo y/o humectante del agua, disminuyendo la tensión superficial lo que permite la entrada del ingrediente activo del detergente a la materia que nos interesa retirar; ésto también proporciona que la microflora se libere y concentre en la película superficial del agua, aumentando su actividad en esta zona (Ilin, E. I., 1985).

Recordando que la degradabilidad biológica no solo depende de la estructura del detergente sino también de los parámetros físico-químicos del medio, en donde destaca el efecto del pH.

En este estudio por lo menos existen tres aspectos importantes, que influyen el experimento: 1) el pH determina mecanismos de transporte biológico molecular a través de la membrana; 2) regula la capacidad de adherencia hacia las superficies a colonizar, y 3) en cuanto a los procesos de elaboración de detergentes, el pH constituye un factor determinante pues su funcionalidad está basada en la polaridad de la molécula.

El factor común de los detergentes *biodegradables* es la estructura química lineal formada por largas cadenas de hidrocarburos y una parte polar activa, que es atractiva químicamente a los microorganismos para ser utilizados como fuentes de carbono y puedan ser digeridos por ellos (Terziç, S. Hrsak, D. y Ahel, M. 1992).

La diferencia en el grado de contaminación estriba en la construcción química de la cadena de hidrocarburos, si éstos son ramificados causan una disminución en la velocidad de reacción, y si son lineales facilitan la biodegradación, esto se debe principalmente a dos factores 1) la estructura química en cuanto a componentes, distribución espacial y el ángulo de orientación, lo cual determina la exposición de los sitios activos a los sustratos o inhibidores presentes en el medio; y 2) esta estructura hace que los microorganismos utilicen menos complejos metabólicos y aumenten la eficiencia en el metabolismo (Romano. P y Ranzani M. 1992).

En otros estudios se encontró que la degradabilidad biológica de los copolímeros depende del contenido de moléculas de alcohol vinílico en la cadena del polímero (Matsumura, S; Shigeno, H. y Tanaka, T. 1993).

Esta facilidad de degradar detergentes con moléculas de alcohol también es expuesta por Steber y Wierich (1987) en estudios anaerobios con alcoholes etoxilatos, en donde se pudo ver, que a mayor longitud de la cadena conteniendo gran cantidad de estos alcoholes la biodegradación aumenta. También lleva a cabo un análisis de la degradación aerobia para este mismo

tensoactivo donde la rapidez de degradación aumenta enormemente, formándose moléculas de ethilenglycoles; los productos de degradación se forman a partir de dos diferentes rutas, logrando la oxidación de la cadena alquilo del tensoactivo, constituyendo la primera fase del mecanismo de degradación primaria; este trabajo sugiere la existencia de una segunda fase dentro de la degradación primaria.

Un polímero de alto peso molecular contiene segmentos biodegradables los cuales son fragmentados por los microorganismos y luego asimilados por ellos mismos (Matsumura, S; Shigeno, H. y Tanaka, T. 1993).

Ahora bien, si por un lado el detergente es utilizado como fuente de carbono, por otro lado la parte polar es sumamente agresiva al microorganismo a nivel celular, específicamente en la membrana, la cual es solubilizada aún en concentraciones bajas. Este efecto, se nota en los estudios hechos por Roy, D. 1989(a), 1989 (b) en donde se pudo ver una reducción de actividad enzimática en tejidos branquiales y operculares con una dosis de experimental de 6.9 mg/l de dodecil-bencen sulfonato de sodio, concentración muy semejante a la encontrada de AAS en el influente de la planta.

Borham, M. y Rasco, B. 1992. en sus estudios confirman que diferentes detergentes iónicos y no-iónicos solubilizan el retículo endoplásmico principalmente en las recubiertas proteicas afectando severamente la actividad enzimática (peroxidativa), en dichos estudios se llegaron a registrar porcentajes del 85% de reducción de actividad enzimática y el 97% de solubilización de fosfolípidos.

Cabe mencionar que existen dos tipos de retículo endoplásmico, el liso y el rugoso; este último tiene ribosomas unidos a su superficie. La síntesis de las proteínas y los procesos de respiración esta asociada al retículo endoplásmico rugoso; donde los ribosomas llevan a cabo los procesos de respiración o catabolismo (De Robertis, R. y De Robertis, E., 1985).

Es conocido que tanto en su estructura como en su comportamiento bioquímico, los procariones y los eucariones tienen muchos aspectos

diferentes, sin embargo, todas las células tienen su marco estructural fundamentado en membranas. Si se toma en cuenta que la biopelícula esta formada en su mayoría de organismos procariotes, cuyo núcleo se encuentra desnudo y carece de mitocondrias, y las enzimas se encuentran adheridas a las membranas celulares ésto representa un efecto altamente nocivo para la comunidad que forma la biopelícula.

Por lo tanto, es muy probable que el AAS tenga el mismo efecto, ya que las gráficas de resultados indican una clara inhibición respiratoria.

Se ha visto que en la primera etapa, existe evidencia de una posible recuperación, lo cual se debe a los procesos de adaptación y resistencia al medio, principalmente de las bacterias heterótrofas que son las predominantes en esta etapa. En el estudio realizado por Takada, H. e Ishiwatari, R. (1987) se afirma que la capacidad de la biopelícula para realmente degradar LAS es probablemente la adaptación a las aguas domésticas no tratadas ingresadas continuamente a la corriente. Los microorganismos pueden desarrollar una exposición crónica a LAS y adaptarse, algunas investigaciones observan que la exposición a xenobióticos causan poblaciones microbianas capaces de degradar rápidamente en concentraciones constantes; sin embargo, la biopelícula no puede ser responsable de contaminantes introducidos intermitentemente.

Si se analiza a las comunidades que componen la biopelícula se puede apreciar que en la primera etapa hay una gran predominancia de bacterias heterótrofas, las cuales presentan un amplio rango de adaptación (Larson, R. J; *et. al* 1989) lo que indica que pueden degradar una gran cantidad de sustancias, ya que sus mecanismos metabólicos son muy versátiles pues se producen una gran variedad y cantidad de compuestos intermedios durante el metabolismo aumentando la concentración de [ES] y con ello la probabilidad de acción del inhibidor, lo cual se puede ver en la gráfica 8.9 que coincide perfectamente con el esquema de *inhibición acompetitiva*.

En cuanto al análisis cinético de la tercera etapa, donde predominan las bacterias autótrofas sus características de mayor selectividad y sensibilidad a los cambios y condiciones ambientales, se refleja en el esquema

enzimático de la gráfica 8.10 Es conocido que su selección recae en las fuentes de energía y su forma específica de metabolizar, por lo que la agresividad del tensoactivo es mayor, aún a concentraciones menores causando agudos efectos en la biopelícula, esta sensibilidad metabólica va en aumento al grado de disminuir la producción de compuestos necesarios para su metabolismo y permanencia en la comunidad, provocando debilitamiento y muerte masiva de la colonia (desprendimientos) (Ilin, E., 1985).

9 CONCLUSIONES

Finalmente las conclusiones más importantes de este trabajo y algunas recomendaciones para atenuar los efectos de los detergentes (alquil aril sulfonato de sodio, AAS) en los sistemas de tratamiento de aguas residuales con BIODISCO son:

- 1) La presencia de detergentes en concentraciones de 1.5 mg/l de AAS a 6.0 mg/l de AAS en el influente del biodisco, produce una disminución en la rapidez de reacción, esquema clásico de inhibición enzimática.
- 2) Los resultados se ajustaron a un modelo clásico de inhibición acompetitiva tanto para la primera como para la tercera etapa del biodisco.
- 3) El mecanismo de inhibición del alquil aril sulfonato de sodio no afecta directamente al sustrato sino que es parte de una unión

secuencial obligada de dos ligandos, es decir el inhibidor no se une al sustrato si la enzima no lo ha hecho antes, de esta manera se forma un complejo ESI inactivo que bloquea los procesos metabólicos posteriores, retrasando o impidiendo la degradación de otros contaminantes. Este tipo de inhibición hace disminuir a V_{max} y a K_m en igual proporción.

- 4) Con base en los valores de las constantes cinéticas aparentes, de la primera etapa, el grado de inhibición es considerable, pero sin evitar la formación de producto suficiente para llevarse a cabo la respiración y las poblaciones microbianas tengan oportunidad de recuperarse, por lo tanto las concentraciones de exposición, 1.5 mg/l a 6.0 mg/l de AAS, no son lo suficientemente grandes para bloquear la degradación, aunque si retrasa considerablemente la rapidez de ésta.
- 5) En cuanto a la tercera etapa por los valores de las constantes cinéticas aparentes, las concentraciones de AAS de experimentación (1.0 mg/l, 1.5 mg/l y 3.0 mg/l) a pesar de ser menores son sumamente nocivas para las poblaciones microbianas que habitan esta etapa. La inhibición llega a un grado tal que tiende a la muerte masiva de la comunidad bacteriana. Ya que todo el [ES] se está transformando en [ESI] inactivo, lo cual bloquea la formación de productos metabólicos, al parecer de la totalidad de los microorganismos que conforman la biopelícula, por lo que no permite ni la más leve formación de producto que permita una recuperación de la comunidad biológica.
- 6) A pesar de las enormes ventajas de composición química y estructural de la molécula de AAS, un tensoactivo creado para ser *biodegradable*, para el caso de sistemas de tratamiento con película fija como el biodisco esta característica no se manifiesta, ya que la parte polar de la molécula es lo suficientemente agresiva para llegar a disminuir la eficiencia e incluso provocar la muerte de la biopelícula.

- 7) Dadas las concentraciones del influente en el biodisco, las poblaciones microbianas de la primera etapa pueden amortiguar el efecto de concentraciones entre 1.5 a 6.0 mg/l de AAS sin embargo la capacidad del biodisco de degradación en sus posteriores etapas se ve seriamente afectada ya que por las concentraciones de salida, 1.0 a 3.0 mg/l de AAS, son lo suficientemente negativas para la eficiencia e incluso letales para la biopelícula.
- 8) Es necesario investigar que tan fuerte es la unión electroquímica complejo enzimático-tensoactivo y que duración tiene, para conocer el grado de afectación, ya que de acuerdo con el comportamiento de la tercera etapa, este daño parece ser irreversible ya que la tendencia es al aceleramiento de la muerte de las poblaciones microbianas.
- 9) Para que el efecto sea minimizado y según el destino de las aguas tratadas, se recomienda intensificar el tratamiento primario de las aguas residuales y si las concentraciones de los influentes siguen siendo elevadas someter el influente del sistema a un tratamiento previo de filtrado, o floculación que no solo beneficiará el aspecto de los tensoactivos sino también de otros contaminantes.
- 10) Finalmente, se concluye que la relación tensoactivos-microbios, es sumamente compleja e involucra factores no sólo bioquímicos sino también ecológicos de adaptación y sobrevivencia. Por lo que bajo condiciones apropiadas los tensoactivos pueden actuar como bactericidas o bacteriostáticos. Sin embargo, la capacidad del tensoactivo de actuar como bactericida depende enormemente de la especie microbiana, tamaño de la porción hidrofóbica de la molécula del tensoactivo, pureza del agua en términos de materia orgánica en aguas residuales y la presencia de iones que puedan hacer variar el pH o polaridad del medio.

10 LITERATURA CITADA

- Aboul-Kassim, T.A. 1992. Impact of Sewage Disposal on the Distribution and Flux of Detergents in Alexandria Coastal Waters, Egypt. **Wat. Sci. Tech.** Vol. 25(9): 93 - 100.
- Alexander, M. 1980. Introducción a la Microbiología del Suelo. 2a ed. AGT Editor, S.A. México, 491 pp.
- Alonso, T. M.E. 1982. La ciencia de la Vida. McGraw-Hill, México, 139 pp.
- Alleman, J.E., J.A. Veil, y T. J. Canaday, 1982. Scanning Electron Microscope Evaluation of Rotating Biological Contactor Biofilm. **Water Research**. Vol (16):543-550.
- Antonie, R. L. 1976. Fixed Biological Surfaces Wastewater Treatment., CRC Press Inc, Ohio.
- APHA. 1985. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 16a. ed. American Public Health Association, American Water Works Association y Water Pollution Control Federation, Washington, EUA,
- Autotrol Corporation. 1978. Autotrol Wastewater Treatment Systems Design Manual. Autotrol Corporation, Milwaukee, WI.
- Benefield, L. y Randall, C.W. 1980. Biological Process Design for Wastewater Treatment. Prentice Hall, EUA.
- Berth, P. y Jeschke, P; 1989. Consumption and Fields of Application of LAS. **Tenside Surfact. Deter.** Vol. 26: 75 - 79.
- Bohinski, R.C. 1982. Bioquímica. Fondo Educativo Interamericano, México. 667 pp.
- Borham, M. y Rasco, B. 1992. The Effect of Detergents on Solubilization and Activity of the Lipid Peroxidative Enzyme System from the Sarcoplasmic Reticulum of Winter Flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) **J. Aquat. Food Prod. Technol.** Vol 1 (1):85-96.

- Cain, R. B. 1994. Biodegradation of Detergents. *Environ. Biotechnol.* Vol 5: 266-274.
- Campbell, R. 1987, Ecología. Limusa, México, 268 pp.
- Carbajal, P. J.j. 1970. Detergentes Biodegradables. Tesis Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. México, 81 pp.
- CNA. 1994. Programa Agua Limpia. Comisión Nacional del Agua, Subdirección General de Administración del Agua; México. 57 pp.
- Cook, E. E. y Wu, B.C. 1979. Fasting Conditions and Intermittent Loading in a Fixed Film Biological Reactor. *Journal Water Pollution Control Federation*. Vol. 50 (10): 2429 - 2431.
- Cronquist, Arthur. 1984. Introducción a la Botánica. 2a. ed. Continental, México. 848 pp.
- Curds, C.R. y Hawkes (ed.) 1975. Ecological Aspects Used-Water Treatment. Vol. 1 The Organisms and Their Ecology. Academic Press, Londres. 414 pp.
- _____ y _____ 1983. Ecological Aspects Used-Water Treatment. Vol. 3. The Processes and Their Ecology Academic Press, Londres. 340 pp.
- Cutler, W. G. y Davis, R.C. [ed]. 1972. Detergency. Theory and Test Methods. Part I. Marcel Dekker, Inc. Nueva York, 451 pp.
- Çeçen. F. 1992. Physicochemical and Biological Treatability Studies on Surfactant Wastewaters. *Wat. Res.* Vol. 26 (1 - 2): 377 - 386.
- Departamento de Sanidad del Estado de Nueva York, 1990. Manual de Tratamiento de Aguas Negras. Limusa, México. 303 pp
- De Robertis, R.D.P. y De Robertis, E.M.F. 1985. Biología Celular y Molecular. 10a. ed. El Ateneo, Buenos Aires, 613 pp.
- Demidovich, B.P. y Maron, A. I. 1976. Computational Mathematics. Ed. Mir. Moscú 691pp.

- DGCOH, 1989. Planta de Tratamiento de Aguas Residuales San Luis Tlaxiátemalco. Folleto Divulgación, **Secretaría General de Obras**, México.
- Díaz, M.L. 1987. Determinación Cinética en Películas Biológicas para Tratamiento de Aguas de Desecho. Tesis de Maestría en Ciencias. Instituto de Ingeniería de la U.N.A.M., México.
- Dubos, R. y Maya, P. 1974. Salud y Enfermedad. Colección Científica Time-Life. México, 198 pp.
- Dupont, R. R. y McKinney, R. E. 1980. Data Evaluation of a Municipal Rbc Installation, Kirksville, Missouri. I National Symposium and Workshop on RBC Technology, Champion, Pennsylvania.
- Eganhouse, R. P; Blumfield, D.L. y Kaplan, I.R. 1988. Long-Chain Alkilbenzenes as Molecular Tracers of Domestic Wastes in the Marine Environment. *Envir. Sci. Technol.* Vol. 17: 523 - 530.
- Espinosa, R; Gutiérrez, T. y López, V. 1988. Efecto de los Detergentes en la Población Bacteriana de un Sistema de Lodos Activados. **Memorias del VI Congreso Nacional. Saneamiento Ambiental, El Gran Reto**. Ago. Querétaro, Qro. México.
- Friedman, A., Robbins, L. y Woods, R. 1979. Effect on Disk Rotational Speed on Biological Contactor Efficiency. *Journal Water Pollution Control Federation* Vol. 51 (11): 2678 - 2690.
- García, M. M. 1990. El Lado Oscuro de los Detergentes. *Revista del Consumidor*. Oct. (164):17 -19.
- Gaudy, A. y Gaudy, E. 1981. Microbiology for Environmental Scientists and Engineers. McGraw-Hill. Series in Water Resources and Environmental Engineering. E.U.A.
- Gloxhuber, Ch. y Künstler, K. [ed.]. 1992. Anionic Surfactants. Biochemistry, Toxicology and Dermatology. 2ª ed. Marcel Dekker, Inc. Nueva York. 471 pp.
- González, M.S. 1992. Simposio Internacional sobre Control de Polución de Aguas por Procesos Biológicos. Universidad De Carabobo, Facultad de Ingeniería , Valencia Venezuela.

- González, M.S. y Díaz, M.L. 1985. Determinación Cinética en Películas Biológicas para Tratamiento de Aguas de Desecho. Informe de Avance de Proyecto. Proyecto 4319. Instituto de Ingeniería de la U.N.A.M., México, 38 pp.
- _____ y Castro, E. J. 1989. Diseño de Biodiscos. Series del Instituto de Ingeniería No. 520. Instituto de Ingeniería UNAM, México. 120 pp.
- Guía del Consumidor, 1975. Limpieza Contra Mugre. Organo de Difusión del Instituto Mexicano de estudios para la Defensa del Consumidor. A.C. Ene. (34):11 - 22.**
- _____, 1976. El Lado Negro de los Detergentes. Una llamada de atención contra su uso imoderado. **Organo de Difusión del Instituto Mexicano de estudios para la Defensa del Consumidor. A. C. Mar. (48):4 - 12.**
- Harremoës, P. 1978. Biofilm Kinetics. En: Water Pollution Microbiology, Vol. 2. Mitchel, 2a. ed. John Wiley and Sons, E. U. A.
- Hashim, M.A. y Kulandai, J. 1989. Aerobic Treatment of Branched Alkylbenzene Sulfonates. **J. Cham. Tech. Biotechnol. (44): 195-204.**
- Holt, M.S. y Bernstein, S.L; 1992. Linear Alkylbenzenes in Sewage Sludges and Sludge Amended Soils. **Wat. Res. Vol. 26 (5): 613 - 624.**
- Ilin, E. I. 1985. Sanitary-Microbiological Evaluation of Barrier Function of Modern Tap Water Purifying Structures During Contamination of Hydrosphere With Surface-Active Agents. **Gig. Sanit. (12): 10- 13.**
- Josephson, J. 1982. Fixed-film Biological Processes. **Environmental Science and Technology. Vol. 16 (7): 380A - 384A .**
- Kudo, R.R. 1972. Protozoología. Ed. C.E.C.S.A., México.
- Larson, R. J; Federle, T. W; Shimp, R. J. y Ventullo, R.M. 1989. Behaviour of Linear Alkylbenzene Sulfonate (LAS) in Soil Infiltration and Groundwater. **Tenside, Surfactants Detergents Vol. 26 (2):116-121.**

- Lehninger, A. 1979. Bioquímica. Omega. Barcelona.
- Leyva, R. 1989. Effect of Temperature and pH on the Adsorption of an Anionic Detergent on Activated Carbon. **J. Chem. Tech. Biotechnol.** 231-240.
- Lewis, M.A. 1991. Chronic and Sublethal Toxicities of Surfactants to Aquatic Animals: a Review and Risk Assessment. **Wat. Res.** Vol.25: 101-113.
- Lomeli, E. [Ed.]. 1984a. Los Detergentes como Causantes de Alergias y Diversos Padecimientos. **La voz del consumidor**. Vol. II (2):16 - 18.
- _____. 1984 b. Los Limpiadores de Uso Doméstico. **La voz del consumidor**. Vol. II (2):19 - 20.
- Luna, V; Alandro, L. y Durán, C. 1990. Microorganismos Indicadores del Tratamiento Biológico de Aguas Residuales: Efecto de la Temperatura Sobre Diversidad y Abundancia de Protozoarios Ciliados. Programa de Ingeniería Ambiental y Química Ambiental. Facultad de Química, U.N.A.M; México
- Malagrino, W; Pereira, N. y Rocha, A.A. 1987. Effect of Low Concentrations of Anionic Detergents on the Abyssal Activity of *Brachidontes solisianus*. **Ambiente**. Vol. 1 (1): 37 - 39.
- Matsumura, S; Shigeno, H. y Tanaka, T. 1993. Builder Performance in Detergent Formulations and Biodegradability of Poly (Sodium Carboxylate) Containing Vinyl Alcohol Groups. **Journal of the American Oil Chemist's Society**. Vol. 70(7):659-665
- Metcalf y Eddy, INC. 1985. Wastewater Engineering: Treatment Disposal Reuse. 2a. ed. McGraw-Hill, Nueva York. 920 pp.
- Möeller, G. y Fernández, G. 1986. Adaptación de Microorganismos para Biodegradación de Detergentes del Tipo ABS. **Memorias del V Congreso Nacional de Ingeniería Sanitaria y Ambiental**. Oct., Puebla, Pue. México.

- Moreno, R. G. 1985. Análisis de Protozoarios en un Sistema de Biodiscos Empleado en la Planta de Tratamiento de C.U. Facultad de Ciencias, Tesis Biología .Ciudad Universitaria, México. 90 pp
- Murray, R. S. 1982.Estadística, McGraw-Hill, México357 pp.
- Nava, R.C. 1992. Determinación de la Cinética en Películas Biológicas por Medio de Respirometría. Tesis de licenciatura. Escuela Nacional de Educación Profesional, Iztacala, México. 93 pp.
- Norouzian, Miryoussef. 1983. A Performance Evaluation and Kinetics Determination of an RBC System Operating at the C.U. Wastewater Treatment Plant. Project Report number 3306. Instituto de Ingeniería U.N.A.M., Ciudad Universitaria, México.
- _____. 1984a. A Microbial Study of a Structurally Modified RBC System. In, Proceedings of The Second International Conference on Fixed-film Biological Processes, Julio, Arlington, Virginia USA.
- _____. 1984b. Microbiology of Fixed-film Processes. Memorias del II Curso y Simposio Internacional sobre Biología de la Contaminación. ENEP, Iztacala. UNAM, México.
- Okpokwasili, G.C. y Olisa, A. O. 1991. River-Water Biodegradation of Surfactants in Liquid Detergents and Shampoos. **Wat. Res.** Vol. 25 (11): 1425-1429.
- Panoy, A. y Middlebrooks, E. J. 1983. Kinetics of Carbon and Ammonia Nitrogen Removal in RBCs. **Journal Water Pollution Control Federation** Vol. 51 (7): 956 - 965.
- Pelczar, J.M. jr; Reid, D.R. y Chan, S.C.E. 1992. Microbiología, 4a. ed McGraw-Hill, México. 826 pp.
- Pickup, J. 1990. Detergents and the Environment: An Industry View. **Chemistry & Industry**. Marzo :174-177.
- Poon, C. P. C., Chao, Y. y Mikucki, W.J. 1979. Factors Controlling Rotating Biological Contactor Performance. **Journal Water Pollution Control Federation** Vol. 51 (3): 601 - 611

- Rapaport, R. A. y Eckhoff, W.S. 1990. Monitoring Linear Alkyl Benzene Sulfonate in the Environment: 1973 - 1986. **Envir. Toxicol. Chem.** Vol. 9 : 1245 -1247.
- Romano. P y Ranzani M. 1992. Anionic Surfactants Removal and Biodegradation in a Large Treatment Plant. **Wat. Sci. Tech.** Vol. 26 (9-11): 2547 - 2550.
- Roy, D. 1989(a). Detergent-Induced Changes in the Mapping of Certain Enzymes in Various Cell Types of *Rita rita* 1. Opercular epidermis. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** Vol. 17 (1):59-66
- _____.1989(b). Detergent-Induced Changes in the Mapping of Certain Enzymes in Various Cell Types of *Rita rita* 2. Gill epithelium. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** Vol. 17 (1):67-74.
- Sabil, N.,Cherqui,A., Tagliapietra, D y Coletti-Previero, M-A. 1994. Inmobilizaed Enzimatic Activity in the Venice Lagoon Sediment. **Wat. Res.** Vol. 28 (1): 77-84.
- Sawyer, C.N. y McCarty, P.C.1978. Chemistry for Environmental Engineering. 3^a ed. McGraw-Hill. Tokyo. 532.pp
- Segel, H. I.1982. Cálculos de Bioquímica. 2a. ed. Acribia. Zaragoza, 564 pp.
- Shigehisa, I. y Takane, K.1994. Wastewater Treatment with Microbial Films Technomic Publishing Company, Pennsylvania, E.U. 184 p
- Silver, S; Chakrabarty, B; Igglewski, B. y Kaplan, S. (ed.) 1990. Pseudomonas Biotransformations, Pathogenesis and Evolving Biotechnology. American Society Microbiology. Washington, D.C. 423 pp
- Stalmans, M; Matthijs, E; y De Oude, N.T. 1991. Fate and Effect of Detergent Chemicals in the Marine and Estuarine Environment. **Wat. Sci. Tech.** Vol. 24 (10): 115 - 126.
- Steber, J. y Wierich, P. 1987. The Anaerobic Degradation of Detergent Range Fatty Alcohol Ethoxylates. Studies with ¹⁴C-Labelled Model Surfactants. **Wat. Res.** Vol. 21(6): 661-667.

- Swisher, R. D. 1987. Surfactant Biodegradation. 2^a ed. Marcel Dekker, Inc. Nueva York. 1063 pp
- Takada, H. e Ishiwatari, R. 1987. Linear Alkylbenzenes in Urban Riverine Environments in Tokyo: Distribution, Source and Behaviour. **Envir. Sci. Technol.** Vol. 21 : 875 - 883.
- Tebbutt, T.H.Y. 1990. Principles of Water Quality Control. 4a. ed. Pergamon Press, Oxford. 251 pp.
- Terziç, S. Hrsak, D. y Ahel, M. 1992. Primary Biodegradation Kinetics of Linear Alkylbenzene Sulphonates in Estuarine Waters. **Wat. Res.** Vol. 26(5): 585-591.
- Winkler, M.A. 1986. Tratamiento Biológico de Aguas de Desecho. Limusa, México. 338 pp.
- W.P.C.F. 1988, O & M of Trickling Filters, RBCs, and Related Processes. In. Manual of Practice for Water Pollution Control OM-10. Water Pollution Control Federation; Virginia, 139 pp.
- Wuhrmann, K. 1964. Grundlagen fuer die Dimensionierung der Belueftung Bei Belebtsch Lamman Lagen. **Schweiz, Z. Hydriol.** Vol. 26: 310 - 337 p

APÉNDICE

23 de agosto de 1994.

PRIMERA ETAPA.

Respiración

| Lectura Original | | | | | | |
|------------------|----------|----------|-----|-----|-----|-----|
| Timepo | Turnover | Endogeno | (1) | (2) | (3) | (4) |
| 0 | 200 | 200 | 200 | 200 | 200 | 200 |
| 5 | 201 | 200 | 198 | 197 | 199 | 200 |
| 10 | 202 | 200 | 197 | 195 | 198 | 199 |
| 15 | 202 | 200 | 198 | 194 | 198 | 198 |
| 20 | 202 | 199 | 193 | 190 | 198 | 197 |
| 25 | 201 | 198 | 191 | 187 | 194 | 195 |
| 30 | 201 | 198 | 188 | 183 | 193 | 194 |
| 35 | 201 | 195 | 185 | 181 | 190 | 192 |
| 40 | 201 | 194 | 183 | 177 | 187 | 190 |
| 45 | 200 | 191 | 180 | 174 | 185 | 188 |
| 50 | 200 | 190 | 177 | 170 | 182 | 186 |
| 55 | 200 | 188 | 174 | 167 | 180 | 185 |
| 60 | 200 | 187 | 173 | 164 | 177 | 183 |
| 65 | 200 | 185 | 170 | 160 | 175 | 181 |
| 70 | 199 | 184 | 167 | 157 | 172 | 179 |
| 75 | 199 | 181 | 164 | 153 | 169 | 176 |
| 80 | 198 | 179 | 161 | 149 | 166 | 174 |
| 85 | 199 | 177 | 159 | 145 | 163 | 172 |
| 90 | 199 | 175 | 156 | 142 | 161 | 170 |
| 95 | 199 | 173 | 153 | 138 | 159 | 168 |
| 100 | 199 | 172 | 152 | 137 | 157 | 167 |
| 105 | 199 | 171 | 149 | 133 | 154 | 165 |
| 110 | 199 | 168 | 145 | 128 | 150 | 162 |
| 115 | 200 | 167 | 143 | 125 | 148 | 161 |
| 120 | 201 | 165 | 141 | 123 | 147 | 160 |
| 125 | 202 | 164 | 140 | 120 | 144 | 159 |
| 130 | 202 | 163 | 137 | 117 | 142 | 157 |
| 135 | 202 | 162 | 135 | 114 | 141 | 156 |
| 140 | 202 | 161 | 134 | 112 | 139 | 155 |
| 145 | 201 | 160 | 133 | 110 | 138 | 154 |
| 150 | 201 | 159 | 130 | 107 | 135 | 153 |
| 155 | 201 | 158 | 129 | 105 | 134 | 153 |
| 160 | 201 | 158 | 128 | 103 | 133 | 152 |
| 165 | 201 | 158 | 127 | 102 | 132 | 151 |
| 170 | 202 | 157 | 128 | 99 | 130 | 151 |
| 175 | 202 | 156 | 125 | 98 | 128 | 150 |
| 180 | 201 | 155 | 122 | 94 | 127 | 149 |
| 185 | 201 | 154 | 121 | 92 | 125 | 148 |
| 190 | 201 | 153 | 119 | 91 | 122 | 146 |
| 195 | 201 | 152 | 118 | 88 | 121 | 145 |

23 de agosto de 1994.

PRIMERA ETAPA.

Respiración

| Respiración Total | | | | | |
|-------------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | Endogena | (1) | (2) | (3) | (4) |
| K's = | 0.676027 | 0.676083 | 0.67491 | 0.675206 | 0.67491 |
| | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | -0.67003 | 0.676083 | 1.34982 | 0 | -0.67491 |
| | -0.67003 | 1.352167 | 2.69984 | 0.675206 | 0 |
| | 0 | 2.704333 | 4.04946 | 1.350412 | 1.34982 |
| | 0.670027 | 4.732583 | 6.7491 | 2.700824 | 2.02473 |
| | 2.010082 | 6.760833 | 9.44874 | 4.728441 | 4.04946 |
| | 2.680109 | 6.113 | 11.47347 | 4.728441 | 4.04946 |
| | 3.350136 | 10.14125 | 12.62329 | 6.752059 | 5.36928 |
| | 4.020163 | 11.49342 | 15.52293 | 8.777677 | 6.7491 |
| | 6.700272 | 14.19775 | 18.22257 | 10.80329 | 8.77383 |
| | 8.700272 | 15.54992 | 20.2473 | 12.15371 | 9.44874 |
| | 8.040328 | 17.57817 | 22.27203 | 13.50412 | 10.12365 |
| | 8.710354 | 18.25425 | 24.29678 | 15.52974 | 11.47347 |
| | 10.05041 | 20.2825 | 26.9984 | 18.88015 | 12.62329 |
| | 11.39046 | 22.98683 | 29.69604 | 19.58097 | 14.84802 |
| | 12.73052 | 24.339 | 31.72077 | 20.93138 | 16.19784 |
| | 14.7408 | 27.04333 | 35.09532 | 23.63221 | 16.22257 |
| | 14.7408 | 27.04333 | 36.44514 | 24.30741 | 16.22257 |
| | 16.75068 | 28.74767 | 39.14478 | 26.33303 | 20.2473 |
| | 16.09073 | 31.77592 | 41.84442 | 27.88344 | 21.59712 |
| | 18.76076 | 32.452 | 42.51933 | 29.03385 | 22.27203 |
| | 19.43079 | 34.48025 | 45.21897 | 31.05947 | 23.62185 |
| | 21.44087 | 37.18458 | 48.59352 | 33.76029 | 25.64658 |
| | 21.44087 | 37.86067 | 49.94334 | 34.4355 | 25.64658 |
| | 22.78092 | 39.21283 | 51.29318 | 35.11071 | 26.32149 |
| | 23.45095 | 39.88892 | 53.31789 | 37.13632 | 26.9984 |
| | 24.79101 | 42.59325 | 56.01753 | 39.16194 | 29.02113 |
| | 25.46103 | 43.94542 | 58.04226 | 39.83715 | 29.69604 |
| | 26.13106 | 44.6215 | 59.39208 | 41.18758 | 30.37095 |
| | 27.47112 | 45.97366 | 61.41681 | 42.53797 | 31.72077 |
| | 27.47112 | 47.32583 | 62.76663 | 43.88838 | 31.72077 |
| | 28.14114 | 48.00191 | 64.11645 | 44.56359 | 31.72077 |
| | 28.14114 | 48.678 | 65.46627 | 45.23879 | 32.39568 |
| | 28.14114 | 49.35408 | 66.14118 | 45.914 | 33.07059 |
| | 28.14114 | 49.35408 | 67.491 | 46.58921 | 32.39568 |
| | 29.4812 | 50.70625 | 68.84062 | 46.61482 | 33.7455 |
| | 30.82125 | 53.41058 | 72.21537 | 49.96524 | 35.09532 |
| | 30.82125 | 53.41058 | 72.89028 | 50.64044 | 35.09532 |
| | 31.49128 | 54.76275 | 73.56519 | 52.66606 | 36.44514 |
| | 32.16131 | 55.43883 | 75.58992 | 53.34127 | 37.12005 |

23 de agosto de 1994.

PRIMERA ETAPA.

Respiración

| Respiración Meta | | | |
|------------------|----------|----------|---------|
| (1) | (2) | (3) | (4) |
| 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1.352167 | 2.02473 | 0.675206 | 0 |
| 2.02825 | 3.37455 | 1.350412 | 0.67491 |
| 2.704333 | 4.04946 | 1.350412 | 1.34982 |
| 4.0565 | 6.07419 | 2.025618 | 1.34982 |
| 4.732583 | 7.42401 | 2.700824 | 2.02473 |
| 5.408666 | 8.77383 | 2.025618 | 1.34982 |
| 6.760833 | 9.44874 | 3.376029 | 2.02473 |
| 7.436916 | 11.47347 | 4.726441 | 2.69964 |
| 7.436916 | 11.47347 | 4.051235 | 2.02473 |
| 8.789083 | 13.4982 | 5.401647 | 2.69964 |
| 9.465166 | 14.17311 | 5.401647 | 2.02473 |
| 9.465166 | 15.52293 | 6.752059 | 2.69964 |
| 10.14125 | 16.87275 | 6.752059 | 2.69964 |
| 11.49342 | 18.22257 | 8.102471 | 3.37455 |
| 11.49342 | 18.89748 | 8.102471 | 3.37455 |
| 12.1695 | 20.2473 | 3.777677 | 3.37455 |
| 12.1695 | 21.59712 | 9.452882 | 3.37455 |
| 12.84558 | 22.27203 | 9.452882 | 3.37455 |
| 13.52167 | 23.62185 | 9.452882 | 3.37455 |
| 13.52167 | 23.62185 | 10.12809 | 3.37455 |
| 14.87383 | 25.64658 | 11.4785 | 4.04946 |
| 15.54992 | 26.9964 | 12.15371 | 4.04946 |
| 16.226 | 28.34622 | 12.82891 | 4.04946 |
| 16.226 | 28.34622 | 12.15371 | 3.37455 |
| 16.226 | 29.69604 | 13.50412 | 3.37455 |
| 17.57817 | 31.04586 | 14.17932 | 4.04946 |
| 18.25425 | 32.39568 | 14.17932 | 4.04946 |
| 18.25425 | 33.07059 | 14.85453 | 4.04946 |
| 18.25425 | 33.7455 | 14.85453 | 4.04946 |
| 19.60642 | 35.09532 | 16.20494 | 4.04946 |
| 19.60642 | 35.77023 | 16.20494 | 3.37455 |
| 20.2825 | 37.12005 | 16.88015 | 4.04946 |
| 20.95858 | 37.79496 | 17.55535 | 4.72437 |
| 20.95858 | 39.14478 | 18.23056 | 4.04946 |
| 20.95858 | 39.14478 | 18.90576 | 4.04946 |
| 22.31075 | 41.16951 | 18.90576 | 4.04946 |
| 22.31075 | 41.84442 | 19.58097 | 4.04946 |
| 22.98683 | 41.84442 | 20.93138 | 4.72437 |
| 22.98683 | 43.19424 | 20.93138 | 4.72437 |

31 de agosto de 1994

TERCERA ETAPA.

RESPIRACION

| Lectura Original | | | | | | |
|------------------|-------------|----------|-----|-----|-----|-----|
| Temperatura | Temperatura | Endogena | (U) | (B) | (E) | (M) |
| 0 | 200 | 200 | 200 | 200 | 200 | 200 |
| 5 | 199 | 183 | 197 | 184 | 198 | 197 |
| 10 | 198 | 188 | 194 | 180 | 194 | 193 |
| 15 | 199 | 183 | 190 | 186 | 193 | 190 |
| 20 | 199 | 179 | 186 | 183 | 185 | 187 |
| 25 | 200 | 174 | 184 | 180 | 182 | 184 |
| 30 | 199 | 170 | 180 | 177 | 179 | 182 |
| 35 | 200 | 168 | 179 | 174 | 177 | 180 |
| 40 | 200 | 163 | 176 | 173 | 174 | 178 |
| 45 | 200 | 160 | 174 | 169 | 171 | 178 |
| 50 | 200 | 157 | 173 | 168 | 170 | 175 |
| 55 | 201 | 156 | 172 | 167 | 169 | 173 |
| 60 | 200 | 153 | 169 | 165 | 168 | 171 |
| 65 | 201 | 150 | 168 | 164 | 165 | 169 |
| 70 | 201 | 147 | 166 | 162 | 164 | 167 |
| 75 | 202 | 145 | 164 | 161 | 163 | 165 |
| 80 | 202 | 142 | 162 | 160 | 162 | 164 |
| 85 | 201 | 140 | 161 | 158 | 159 | 163 |
| 90 | 202 | 138 | 160 | 156 | 158 | 161 |

RESPIRACION

| Respiracion Total | | | | | |
|-------------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | Endogena | (1) | (2) | (3) | (4) |
| Nº = | 0.67602721 | 0.67602721 | 0.67480997 | 0.67520589 | 0.67480997 |
| | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 5.36021785 | 2.70433323 | 4.72436978 | 3.37602945 | 2.69863686 |
| | 8.71035387 | 4.73258318 | 7.42400963 | 4.72844124 | 5.36927973 |
| | 10.7204353 | 6.08474977 | 8.77382956 | 4.05123534 | 6.07418089 |
| | 14.0705713 | 8.46518631 | 11.4734694 | 10.1280884 | 8.77382956 |
| | 18.7508401 | 10.1412498 | 12.8232894 | 11.4785001 | 10.1238495 |
| | 20.7708434 | 14.1977495 | 18.1978392 | 14.8548288 | 12.8232894 |
| | 22.1108878 | 13.5218882 | 18.8727491 | 14.8548288 | 12.8232894 |
| | 24.7910088 | 18.2258984 | 18.2225891 | 17.5553632 | 14.8480193 |
| | 28.8010882 | 17.578189 | 20.9222089 | 19.5809708 | 18.1978392 |
| | 28.8111898 | 18.2542493 | 21.5971189 | 20.2581787 | 18.8727491 |
| | 28.8111898 | 18.2542493 | 21.5971189 | 20.2581787 | 17.5478581 |
| | 32.1813059 | 21.8348959 | 24.2997588 | 22.2817944 | 20.247299 |
| | 32.8313331 | 20.8585825 | 23.6218488 | 22.9570003 | 20.247299 |
| | 36.5114419 | 22.8888325 | 25.8485787 | 24.3074121 | 22.2720289 |
| | 38.1814891 | 23.8829158 | 25.8485787 | 24.3074121 | 22.8489388 |
| | 38.8815779 | 25.8811857 | 28.9863988 | 25.6578239 | 24.2997588 |
| | 40.8716585 | 27.0433323 | 29.0211285 | 28.3588474 | 25.8485787 |
| | 40.8716585 | 28.367249 | 29.0211285 | 27.8834415 | 25.8485787 |

| Respiracion Neta | | | |
|------------------|-------------|-------------|-------------|
| (1) | (2) | (3) | (4) |
| 0 | 0 | 0 | 0 |
| -2.70433323 | -0.67480997 | -2.02581787 | -2.89863686 |
| -4.05849985 | -1.34881993 | -4.05123534 | -3.37454983 |
| -4.73258318 | -2.0247299 | -6.75205891 | -4.72436978 |
| -4.73258318 | -2.89863686 | -4.05123534 | -5.36927973 |
| -8.79083308 | -4.0484598 | -5.40184713 | -8.74809989 |
| -8.79083308 | -4.72436978 | -8.07885302 | -8.08891959 |
| -8.788083 | -5.36927973 | -7.4272848 | -8.44873952 |
| -8.788083 | -6.74809988 | -7.4272848 | -10.1238495 |
| -8.46518631 | -8.07418089 | -7.4272848 | -10.7985595 |
| -10.8173329 | -7.42400963 | -8.77787858 | -12.1483794 |
| -10.8173329 | -7.42400963 | -8.77787858 | -11.4734694 |
| -10.8173329 | -8.08891959 | -10.1280884 | -12.1483794 |
| -12.1884985 | -8.44873952 | -10.1280884 | -12.8232894 |
| -12.8455829 | -10.1238495 | -11.4785001 | -13.4981993 |
| -12.8455829 | -10.7985595 | -12.153708 | -13.4981993 |
| -13.5218882 | -12.1483794 | -13.5041178 | -14.8480193 |
| -14.1977495 | -12.1483784 | -12.8289119 | -15.5229292 |
| -14.8738328 | -12.1483784 | -13.5041178 | -15.5229292 |