



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

03072
UNAM
POSGRADO

FACULTAD DE QUÍMICA

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

**DESARROLLO DE UN MODELO ENZIMÁTICO PARA LA
REPRESENTACIÓN DEL PROCESO BIOLÓGICO DE
REMOCIÓN DE FÓSFORO EN AGUAS RESIDUALES**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA
P R E S E N T A :
CLAUDIA NAVA RAMÍREZ

ASESOR: DR. SIMÓN GONZÁLEZ MARTÍNEZ



MÉXICO, D.F.

2003

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

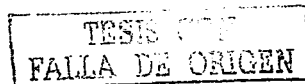
DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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.

ÍNDICE

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1 Problemática	2
1.2 Objetivo	4
1.3 Alcance	5
2. ANTECEDENTES	6
2.1 Procesos para el tratamiento de aguas residuales	6
2.1.1 Procesos secundarios o biológicos	7
2.1.1.1 <i>Clasificación metabólica</i>	7
2.1.1.2 <i>Clasificación basada en la forma de crecimiento</i>	8
2.2 Remoción biológica de fósforo	8
2.2.1 Mecanismo bioquímico	9
2.2.2 Modelos bioquímicos	11
2.3 Cinética enzimática	14
2.3.1 Enzimas como catalizadores biológicos	15
2.3.2 Cinética enzimática clásica	16
2.3.2.1 <i>Pruebas de diagnóstico</i>	18
2.3.2.1.1 <i>Representación de Lineweaver y Burk: 1/v en función de 1/S</i>	19



2.3.2.1.2 <i>Representación de Hanes-Woolf: S/v en función de S</i>	20
2.3.2.1.3 <i>Representación de Woolf-Augustinsson-Hofstee: v en función de v/S</i>	21
2.3.2.1.4 <i>Representación de Eadie-Scatchard: v/S en función de v</i>	22
2.4 Enzimas alostéricas	23
2.4.1 Estructura y función	24
2.4.2 Mecanismos alostéricos	24
2.4.3 Tipos de efectos cooperativos	26
2.4.4 Significado biológico del comportamiento alostérico	27
2.4.5 Modelación y procesos alostéricos	32
2.4.6 Pruebas de diagnóstico	34
2.4.6.1. <i>Representación de Lineweaver y Burk</i>	34
2.4.6.2. <i>Representación de Hill</i>	34
3. MÉTODOS	37
3.1 Descripción del reactor	37
3.2 Operación del reactor	37
3.3 Análisis cinético	39
3.3.1. Aplicación del modelo clásico de Michaelis y Menten	42
3.3.2 Aplicación del modelo alostérico	42
3.3.2.1 <i>Definición del modelo</i>	42
3.3.2.2 <i>Validación del modelo</i>	48
4. RESULTADOS Y ANÁLISIS	51
4.1 Análisis enzimático	52
4.1.1 Aplicación del modelo clásico de Michaelis y Menten	52

4.1.2 Influencias exógenas	60
4.1.2.1 Efecto por fuente de carbono	60
4.1.2.2 Efecto por fuente de nitrógeno	62
4.1.2.3 Efecto por oxígeno disuelto	64
4.1.3 Definición del modelo alostérico	66
4.1.3.1 Determinación del modelo catalítico	70
4.1.3.2 Validación del modelo	82
5. CONCLUSIONES	90
BIBLIOGRAFÍA	93
APÉNDICE	97
TABLA 1. VALORES EXPERIMENTALES OBTENIDOS PARA EL CICLO DE 6H CON 30% DE FASE ANAEROBIA (2 H)	98
TABLA 2. VALORES EXPERIMENTALES OBTENIDOS PARA EL CICLO DE 6H CON 45% DE FASE ANAEROBIA (2.75 H)	98
TABLA 3. VALORES EXPERIMENTALES OBTENIDOS PARA EL CICLO DE 6H CON 63% DE FASE ANAEROBIA (3.75 H)	99
TABLA 4. VALORES EXPERIMENTALES OBTENIDOS PARA EL CICLO DE 8H CON 25% DE FASE ANAEROBIA (2 H)	99
TABLA 5. VALORES EXPERIMENTALES OBTENIDOS PARA EL CICLO DE 8H CON 45% DE FASE ANAEROBIA (3.5 H)	100

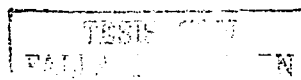
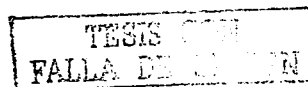


TABLA 6. VALORES EXPERIMENTALES OBTENIDOS PARA EL CICLO DE 8H CON 63% DE FASE ANAEROBIA (5 H).	100
TABLA 7. VALORES EXPERIMENTALES OBTENIDOS PARA EL CICLO DE 12H CON 25% DE FASE ANAEROBIA (3 H)	101
TABLA 8. VALORES EXPERIMENTALES OBTENIDOS PARA EL CICLO DE 12H CON 45% DE FASE ANAEROBIA (5.5H)	102
TABLA 9. VALORES EXPERIMENTALES OBTENIDOS PARA EL CICLO DE 12H CON 63% DE FASE ANAEROBIA (7.5H)	103
TABLA 10 RESULTADOS OBTENIDOS PARA LOS PARÁMETROS ESTADÍSTICOS UTILIZADOS PARA LA SELECCIÓN DEL ORDEN DEL POLINOMIO PARA EL CICLO DE 6 HORAS	104
TABLA 11 RESULTADOS OBTENIDOS PARA LOS PARÁMETROS ESTADÍSTICOS UTILIZADOS PARA LA SELECCIÓN DEL ORDEN DEL POLINOMIO PARA EL CICLO DE 8 HORAS	104
TABLA 12 RESULTADOS OBTENIDOS PARA LOS PARÁMETROS ESTADÍSTICOS UTILIZADOS PARA LA SELECCIÓN DEL ORDEN DEL POLINOMIO PARA EL CICLO DE 12 HORAS	104
TABLA 13. DESARROLLO DEL PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCIÓN DE LOS VALORES DE RAPIDEZ INICIAL DE CONSUMO DE SUSTRATO	105
Ciclo de 6 horas con 25% de fase anaerobia (2 h)	105
Ciclo de 6 horas con 45% de fase anaerobia (2.75 h)	107



Ciclo de 6 horas con 65% de fase anaerobia (3.75 h)	108
Ciclo de 8 horas con 25% de fase anaerobia (2 h)	109
Ciclo de 8 horas con 45% de fase anaerobia (3.5 h)	110
Ciclo de 8 horas con 65% de fase anaerobia (5 h)	111
Ciclo de 12 horas con 25% de fase anaerobia (3 h)	112
Ciclo de 12 horas con 45% de fase anaerobia (5.5 h)	113
Ciclo de 12 horas con 63% de fase anaerobia (7.5 h)	114
TABLA 14. VALORES TEÓRICOS Y CALCULADOS PARA LA PRUEBA "T" DE STUDENT	115

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

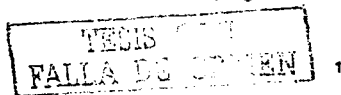
Resumen

El objetivo de este trabajo fue obtener un modelo enzimático para describir la fase aerobia del proceso biológico para remoción de fósforo. Los modelos que se utilizaron se basaron en cinética enzimática clásica (modelo de Michaelis y Menten) y alostérica.

Los resultados obtenidos mostraron que el proceso de captura de fósforo no se ajusta al modelo enzimático clásico, ya que se obtuvieron valores negativos para K_m y V_{max} . Considerando estos resultados, se obtuvo un modelo enzimático alostérico con cuatro sitios de unión, el cual permitió describir el proceso mencionado. La característica principal de las enzimas alostéricas se relaciona con mecanismos cooperativos en la catálisis de reacciones fisiológicas. Con base en los valores de las constantes del modelo, se estableció la existencia de cooperatividad negativa en el mecanismo enzimático involucrado, este tipo de cooperatividad está estrechamente relacionado con procesos de inhibición por sustrato.

La validación del modelo enzimático se realizó comparando valores experimentales y teóricos de concentración de fósforo de ortofosfatos. Los valores teóricos se obtuvieron resolviendo la integral del modelo alostérico, lo cual permitió predecir la tendencia de eliminación de fósforo de ortofosfatos a través del tiempo. La comparación entre valores teóricos y experimentales muestra que el modelo se ajusta al comportamiento observado durante la fase aerobia del proceso de remoción biológica de fósforo.

El modelo permite establecer tiempos de aireación óptimos, lo cual se puede reflejar en beneficios económicos debido a la optimización en el uso de recursos energéticos para aireación y agitación.



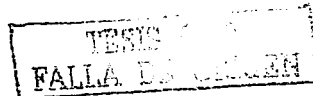
1. INTRODUCCIÓN

1.1 Problemática

El tratamiento de aguas residuales y el reuso de agua tratada adquieren cada día mayor importancia; ésto se debe principalmente a la disminución acelerada de la disponibilidad de agua en las zonas más pobladas, a la creciente contaminación de los cuerpos de agua susceptibles de servir como fuentes de abastecimiento y a la necesidad de cumplir con la legislación ambiental.

Una de las opciones económicamente factibles para el tratamiento de aguas residuales municipales es la utilización de procesos biológicos.

El uso de este tipo de procesos se consideraba tradicionalmente una disciplina ingenieril empírica. Actualmente, se considera que el tratamiento de aguas residuales es una disciplina biotecnológica, que involucra principalmente el



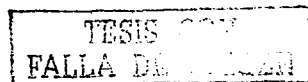
desarrollo de reactores de tecnología avanzada, tanto del tipo aerobio como anaerobio, los cuales se deben adecuar a las necesidades y recursos del país.

Sin embargo, muchos de los procesos que se utilizan actualmente se introdujeron hace más de medio siglo, de tal forma, que el diseño y la operación de las plantas para tratamiento de aguas residuales ha sido muy pragmática. Esto ha ido cambiando en consideración a las demandas actuales, las cuales son más severas que las que pueden ser cubiertas con una simple aproximación.

Entre los reactores de tecnología avanzada están los reactores de biopelícula sumergida, aerobios o anaerobios, los cuales son el tipo de reactor que mayor interés tiene por sus ventajas de poca generación y manejo de lodos, así como por lo compacto y la alta eficiencia mostrada. La operación de este tipo de sistemas en forma discontinua y alternando fases anaerobias-aerobias, reduce notable y eficientemente la concentración de nutrientes contaminantes, principalmente carbono, nitrógeno y fósforo.

Es necesario señalar que la mayor parte de los sistemas para tratamiento de aguas residuales convencionales son capaces de eliminar carbono y nitrógeno, sin embargo, pocos logran eliminar fósforo, lo cual disminuye la calidad del agua tratada y produce eutroficación en los cuerpos de agua en los que se descargan estos efluentes.

Existen tanto procesos fisicoquímicos como biológicos para la remoción de fósforo, sin embargo, estos últimos resultan sumamente atractivos principalmente por razones económicas. La remoción biológica de fósforo se puede realizar sometiendo a los microorganismos aerobios a fases anaerobias-aerobias. Esta forma de operación resulta en una selección de poblaciones bacterianas capaces de almacenar y utilizar fósforo en concentraciones mayores que en condiciones normales.



El desarrollo de un diseño óptimo y una operación eficiente en este tipo de sistemas requiere del conocimiento de las relaciones cinéticas involucradas en las dos fases del proceso. Para hacer posible un análisis cinético global es necesario considerar de manera independiente cada una de las fases, ya que las reacciones bioquímicas involucradas en cada fase son completamente diferentes (Nava-Ramírez y González-Martínez, 1995).

La información relacionada con modelos biocinéticos que describen el proceso de remoción biológica de fósforo es mayor para la fase anaerobia que para la aerobia. Entre los modelos que describen la fase anaerobia, cabe mencionar a los propuestos por Wentzel y col (1985) y Ruiz-Treviño y col (1992). En cuanto a los modelos que describen la fase aerobia, destacan los propuestos por Wentzel y col (1987), Tsuno y col (1987) y Siebritz y col (1983). Estos modelos involucran la determinación de parámetros fisicoquímicos (adicionales a fósforo), tales como demanda química de oxígeno, nitrógeno total Kjeldahl, nitratos, entre otros, los cuales aún y cuando permiten un mejor conocimiento de las condiciones fisicoquímicas del sistema, implican mayor tiempo y recursos para su aplicación.

Todas las reacciones bioquímicas son catalizadas enzimáticamente (Rodwell, 1986), con base en este fundamento, la hipótesis del trabajo es que la fase aerobia del proceso biológico para remoción de fósforo puede ser descrita utilizando un modelo basado en catálisis enzimática. La aplicación de este tipo de modelos requiere básicamente de conocer las mediciones de aparición o consumo de sustratos, lo cual representa una ventaja con respecto a los modelos mencionados anteriormente.

1.2 Objetivo

El objetivo del trabajo fue obtener un modelo enzimático que describa la captura de fósforo (fase aerobia del proceso biológico) en un reactor de biopelícula operado de forma discontinua. La información experimental para el análisis

proviene de trabajos previos realizados por González-Martínez (1989) y González-Martínez y Wilderer (1991).

1.3 Alcance

El alcance principal del trabajo es la definición de un modelo enzimático capaz de predecir el tiempo óptimo de la fase arobia del proceso biológico de remoción de fósforo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

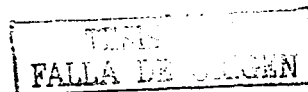
2. ANTECEDENTES

En este capítulo se revisan, de manera general, los diferentes tipos de procesos para tratamiento de aguas residuales, incluyéndose el proceso para remoción biológica de fósforo. Asimismo, se describen los principales fundamentos de cinética enzimática clásica y alostérica.

2.1 Procesos para el tratamiento de aguas residuales

El tratamiento de aguas residuales es una combinación de procesos primarios, secundarios y terciarios, los cuales pueden aplicarse independientemente aunque siempre de manera secuencial y acorde con la finalidad que se persiga.

El objetivo de los procesos primarios es eliminar sólidos de mayor tamaño, así como los más fácilmente sedimentables. Para lograrlo se utilizan métodos como cribado, sedimentación, flotación, filtración, entre otros.



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

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

2.1.1 Procesos secundarios o biológicos

Las características más comunes que se utilizan para clasificar a los sistemas para tratamiento de aguas residuales son el tipo de metabolismo y la forma de crecimiento de los microorganismos.

2.1.1.1 Clasificación metabólica

Considerando el tipo de metabolismo, existen tres tipos de procesos: anaerobios, aerobios y mixtos (Luna y col, 1990).

Procesos biológicos anaerobios. En estos procesos la remoción de materia orgánica se hace por medio de microorganismos que no requieren oxígeno molecular libre en solución, ya que los potenciales de oxidación-reducción necesarios para su subsistencia los obtienen de compuestos inorgánicos aceptores de electrones como los nitritos y nitratos. Un ejemplo de este tipo de procesos son los que se llevan a cabo en los reactores UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket).

TESTE
FALLA DE ORIGEN

Procesos biológicos aerobios. En este tipo de procesos, la remoción de material orgánico soluble se hace por medio de microorganismos que requieren para su desarrollo de suficiente oxígeno molecular libre en solución. Procesos biológicos con estas características se llevan a cabo en reactores de lodos activados, biodiscos y filtros rociadores.

Procesos biológicos mixtos o facultativos. Consisten en una combinación de los procesos anteriores, por lo tanto, intervienen microorganismos aerobios, microaerofílicos, anaerobios y facultativos. Como ejemplo de estos procesos están las lagunas facultativas.

2.1.1.2 Clasificación basada en la forma de crecimiento

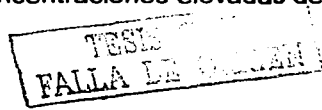
De acuerdo con la forma de crecimiento de los microorganismos, existen dos tipos de procesos: de biomasa suspendida y biopelícula.

Procesos de biomasa suspendida. La característica principal de este tipo de procesos es el crecimiento microbiano en forma de flóculos. El principio del funcionamiento consiste en poner a las aguas residuales en contacto con la población microbiana, de esta forma, se logra eliminar rápidamente materia en suspensión y coloidal. Este proceso se lleva a cabo en los flóculos microbianos e intervienen diferentes fenómenos físicos y bioquímicos (Winkler, 1986). Los lodos activados son un ejemplo de este tipo de procesos.

Procesos de biopelícula. A diferencia de los procesos de biomasa suspendida, los procesos de biopelícula utilizan microorganismos adheridos a una superficie sólida la cual está en contacto con el agua residual, continua o intermitentemente.

2.2 Remoción biológica de fósforo

El fósforo es un nutriente esencial para el crecimiento de plantas y microorganismos. Sin embargo, cuando existen concentraciones elevadas de este



elemento en el agua residual o tratada se producen problemas de eutroficación en los cuerpos receptores (Water Environment Federation, 1983).

Actualmente, el proceso económicamente más factible para eliminar fósforo de las aguas residuales municipales es la eliminación biológica, la cual permite remover este elemento sin necesidad de adicionar sustancias químicas.

El fósforo en aguas residuales se encuentra en tres formas: ortofosfatos (PO_4^{3-}), polifosfatos (P_{207}) y fósforo orgánico (P_{org}). Los ortofosfatos se asimilan fácilmente por los microorganismos, mientras que los polifosfatos y el fósforo orgánico usualmente son hidrolizados por los microorganismos a la forma orto.

2.2.1 Mecanismo bioquímico

Para activar el mecanismo biológico de eliminación de fosfatos es necesario provocar un estado de tensión en las bacterias aerobias. Esto se logra privando a los organismos de uno o más elementos tales como nitrógeno, fósforo, oxígeno o azufre. Algunas bacterias mueren ante estas condiciones, mientras que otras utilizan vías metabólicas alternas.

La forma más fácil de provocar el estado de tensión es suspendiendo el suministro de oxígeno y nitratos y creando condiciones ambientales alternas anaerobias y aerobias en el tiempo. En tales circunstancias, las bacterias aerobias son forzadas a recurrir a mecanismos alternos, en los que se incluye el proceso de remoción biológica de fósforo, mientras que las bacterias facultativas pueden utilizar vías metabólicas fermentativas, sobreviviendo sin dificultad (González-Martínez, 1989).

La figura 2.1 muestra el comportamiento observado durante el proceso de remoción biológica de fósforo. Durante la fase inicial anaerobia, las bacterias aerobias obtienen energía a través de la hidrólisis de cadenas de polifosfatos,

produciéndose un incremento en la concentración extracelular de ortofosfatos. La energía así obtenida se utiliza para capturar y almacenar sustratos carbonosos, observándose prácticamente una eliminación total de éstos.

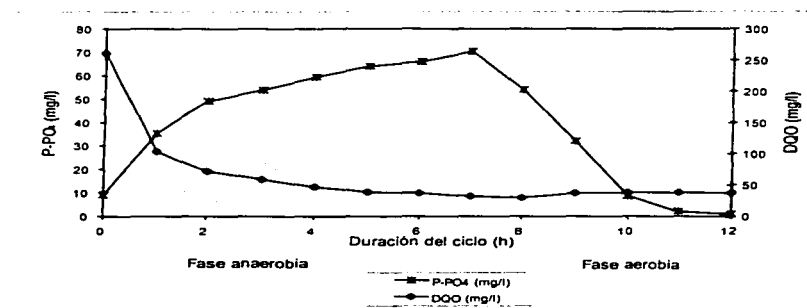


Figura 2.1 Comportamiento observado durante el proceso de eliminación biológica de fósforo (tomado de González-Martínez y Wilderer, 1991)

En la fase aerobia, los microorganismos degradan el material carbonoso previamente almacenado y con la energía obtenida de esta manera vuelven a llenar sus reservas de polifosfatos capturando moléculas de ortofosfatos, preparándose de esta forma para soportar una nueva fase anaerobia (Nava-Ramírez y González-Martínez, 2000).

Los microorganismos almacenan polifosfatos en cantidades superiores a las requeridas por sus funciones metabólicas, de esta forma, se logra separar fosfatos en forma de lodos de exceso (González-Martínez, 1990). Esto se traduce al final del proceso, en una concentración de ortofosfatos en el medio mucho menor que la concentración inicial.

La utilización del mecanismo biológico para remoción de fósforo permite obtener efluentes con concentraciones de este elemento, inferiores a 1 mg/l.

2.2.2 Modelos bioquímicos

Los dos modelos bioquímicos mejor soportados experimentalmente para describir el proceso de captura de fósforo son los de Comeau-Wentzel y Mino, modificado por Wentzel (Doria-Serrano y col, 1992).

Ambos toman en cuenta que los microorganismos considerados responsables de la remoción de fósforo son bacterias del género *Acinetobacter*, bacteria Gram negativa, no motil y estricta aerobia. Algunas especies de este género se conocen por utilizar el acetato como fuente de carbono en una etapa anaerobia, almacenando el carbón orgánico como poli- β -hidroxibutirato (PHB) y usando la energía liberada por la hidrólisis de polifosfato (poliP) para lograr esto. Durante este proceso, el ortofosfato (Pi) es liberado al medio extracelular.

Durante la fase aerobia subsecuente, el Pi es removido en una cantidad mayor que la originalmente presente en el medio. El Pi es transformado a poliP y el PHB es utilizado como fuente de carbono.

Los dos modelos mencionados están de acuerdo en las reacciones involucradas en la síntesis de PHB y la importancia del poliP en el proceso. Bioquímicamente, las reacciones mencionadas pueden resumirse de la siguiente forma:

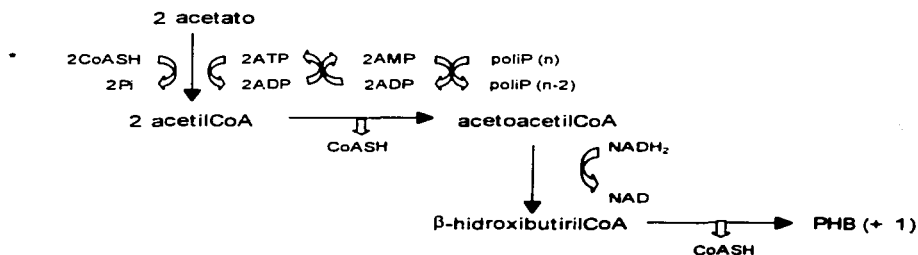
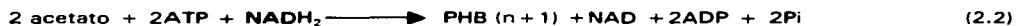


Figura 2.2 Síntesis de PHB (tomado de Doria-Serrano y col (1992))

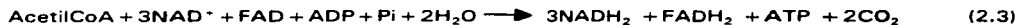
La figura 2.2 involucra a las enzimas AMP polifosfato fosfotransferasa y adenilato quinasa las cuales participan en la síntesis de ATP.

En resumen:

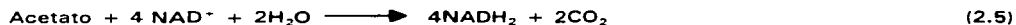


La diferencia entre los modelos de Wentzel y Mino es el origen del NADH_2 , requerido para la reducción del acetilCoA. Wentzel considera que el ciclo del ácido tricarboxílico (CAT) está activo durante la etapa anaerobia produciendo un potencial de reducción.

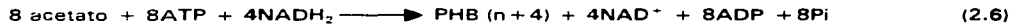
El CAT puede resumirse como sigue:



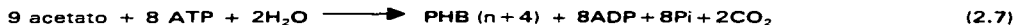
Agregando estas ecuaciones a (2.1):



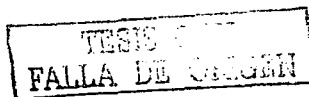
Si todo el NADH_2 generado en el CAT es usado para la síntesis de PHB, entonces la ecuación 2.2 es igual a:



Integrando (2.5) y (2.6):



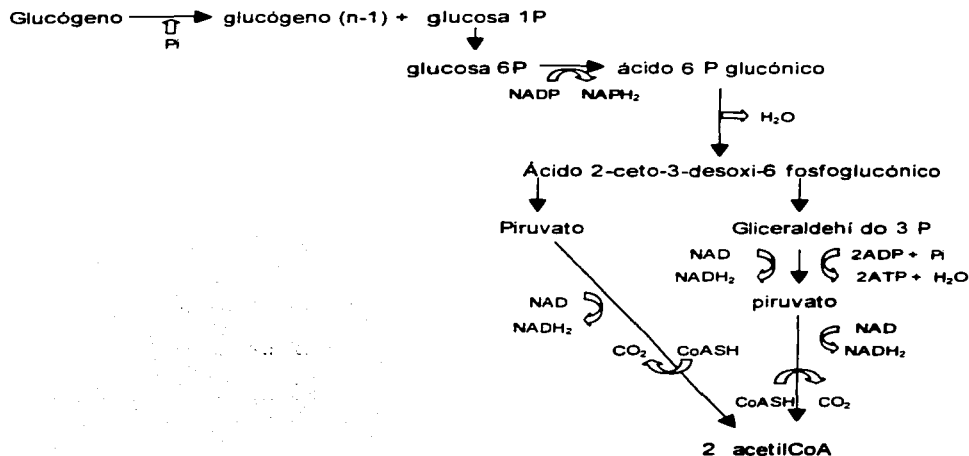
En este modelo la relación acetato consumido:P liberado es 9:8 o 1:1.12.



Wentzel (1986) citado por Doria-Serrano y col (1992), considera que el CAT no incluye al compuesto intermediario succinilCoA, el cual es transformado a ácido succínico produciendo un ATP en una fosforilación a nivel sustrato. Este hecho cambia la ecuación global, de tal forma, que si un ATP más es necesitado, un Pi más es liberado. Este autor establece una relación acetato:Pi de 1:1

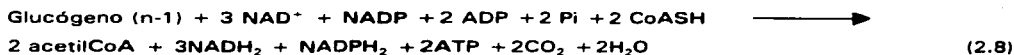
En la etapa aerobia el PHB es transformado a acetilCoA, el cual es oxidado a CO₂ y H₂O, generándose ATP a partir del cual se produce poliP.

El modelo de Mino considera que la glucosa (obtenida de glucógeno, el cual debería ser sintetizado durante la fase aerobia) es oxidada vía Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP) para generar acetilCoA y el NADH₂ necesario para la reacción 2.2. Wentzel y col (1991) observaron que Acinetobacter oxida la glucosa solo, por la vía Entner-Dudoroff, lo cual cambia la relación acetato:Pi de la siguiente forma:



TESIS
FALLA DE CALLEN

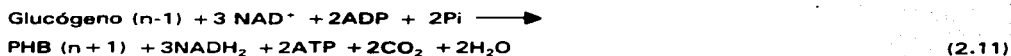
En resumen:



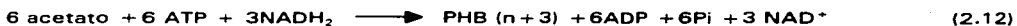
Como:



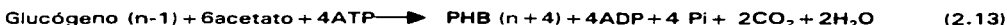
Integrando (2.8), (2.9) y (2.10):



Si todo el NADH_2 es utilizado en (2.2):



Incluyendo (2.11) y (2.12):



En esta última ecuación la relación acetato: Pi es 6:4 o 1.5:1.

En relación a la etapa aerobia, el acetilCoA del PHB es el origen de glucógeno a través del ciclo del glioxilato y el poliP es sintetizado a partir del ATP generado por el NADH_2 en el transporte de electrones y en la oxidación fosforilativa.

2.3 Cinética enzimática

La cinética enzimática es la rama de la enzimología que analiza el efecto de diferentes factores sobre la velocidad de las reacciones catalizadas enzimáticamente. Los factores más importantes son la concentración de enzimas y ligandos (sustratos, productos, inhibidores y activadores), pH, fuerza iónica y temperatura.

Un análisis cinético puede conducir a un modelo para una reacción catalizada enzimáticamente, e inversamente, los principios de la cinética enzimática, pueden utilizarse para escribir la ecuación de velocidad para un modelo idóneo, que puede entonces probarse experimentalmente.

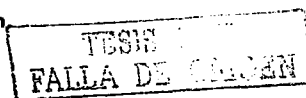
Específicamente, para el caso del comportamiento cinético de las reacciones que se realizan en sistemas para tratamiento de aguas residuales de película biológica, éste está limitado por diferentes fenómenos. Los nutrientes necesitan ser transportados del agua residual a la película biológica, donde se lleva cabo la reacción y los productos, excepto la biomasa, tienen que salir de la célula (Harremoës,1978) . Los fenómenos involucrados son:

- Transporte de sustratos y nutrientes del agua residual a la película biológica.
- Difusión de las moléculas nutritivas hacia la célula a través de la película líquida que se forma sobre la película biológica.
- Sorción de nutrientes en la superficie celular.
- Hidrólisis de las moléculas sorbidas.
- Transporte activo por medio de transferasas hasta los centros de procesamiento.
- Asimilación de sustratos y nutrientes por medio de reacciones enzimáticas.

Con base en los fenómenos listados anteriormente, Harremoës (1978), afirma que cuando el espesor de la película es lo suficientemente pequeño para que permita la difusión de nutrientes desde la superficie hasta las capas más profundas de la biopelícula, los efectos de difusión se vuelven despreciables y solamente la reacción enzimática controla la rapidez global de la reacción.

2.3.1 Enzimas como catalizadores biológicos

Para que una molécula de reactivo o sustrato, S, pueda llegar a transformarse en una molécula de producto, P, debe poseer una energía mínima. La cantidad de energía necesaria se denomina energía de activación.



De acuerdo con la ecuación de Arrhenius, hay dos formas de aumentar la rapidez de la reacción: elevando la temperatura o disminuyendo la energía de activación. La rapidez de la reacción $S \rightarrow P$ depende del número de moléculas de S que alcanzan el estado de transición por unidad de tiempo.

Las células vivas pueden existir a temperaturas relativamente bajas (entre 0 y 100°C). En ausencia de catalizadores, a temperatura fisiológica, pocas, quizás ninguna, de las reacciones del metabolismo intermedio transcurrirían con una velocidad suficiente que permitiese a las células crecer y mantenerse. Las células vivas pueden existir en condiciones ambientales porque poseen enzimas, las cuales son catalizadores biológicos que disminuyen selectivamente las energías de activación de todas las reacciones químicas vitales sin ser consumidas durante la reacción.

Una reacción $S \rightarrow P$ catalizada enzimáticamente se puede escribir como:



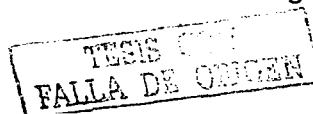
La enzima, E, y S deben combinarse de alguna forma durante la reacción y la secuencia de la reacción total se puede escribir de la siguiente forma:



Aunque la enzima participa en la secuencia de la reacción, no se consume, de tal forma, que pocas moléculas de E catalizan la conversión de miles de moléculas de S en P cada segundo.

2.3.2 Cinética enzimática clásica

La reacción más sencilla catalizada enzimáticamente implica que un único sustrato de lugar a un único producto. La secuencia de la reacción es la siguiente





donde:

$k_1, k_{-1}, k_2, k_{-2}, k_3, k_{-3}$ constantes de rapidez
 ES, EP complejos enzima-sustrato y enzima-producto

Para simplificar, se supone que hay un único complejo central (ES) y que la reacción inversa es insignificante. Esta última suposición es válida si nos referimos a la rapidez inicial, la cual se presenta antes de que exista una concentración significativa de P. Por lo tanto, la reacción se puede escribir como:



Este sistema de reacción es descrito por la ecuación de Michaelis y Menten:

$$v = \frac{V_{\max} \cdot S}{K_m + S} \quad (2.18)$$

donde:

v rapidez inicial de la reacción
 V_{\max} rapidez máxima de la reacción
 S concentración de sustrato
 K_m constante de Michaelis y Menten o constante de saturación media

El modelo de Michaelis y Menten se utiliza para la descripción de la cinética de eliminación de sustratos y expresa la relación entre la concentración de sustrato limitante y la rapidez específica de consumo. La ecuación es válida sólo si v se mide en un tiempo lo suficientemente corto durante el cual la disminución de S sea despreciable. En la práctica este valor corresponde al tiempo en el que se consume de 5 a 10% de sustrato.

La figura 2.3 muestra la representación de la ecuación 2.18. En esta misma gráfica se observan, de manera esquemática V_{max} y K_m , así como tres regiones distintas en las que la rapidez responde de una forma característica al incrementar S .

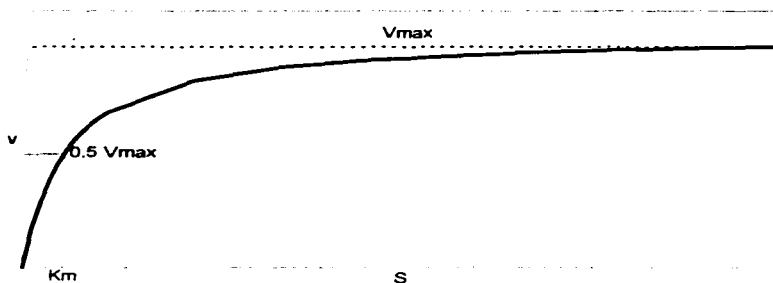


Figura 2.3 Efecto de la concentración de sustrato en la rapidez de reacción (tomado de Conn y Stumpf, 1976)

A concentraciones bajas de sustrato, la representación de v en función de S es prácticamente lineal, es decir, la rapidez a efectos prácticos es directamente proporcional a las concentraciones de sustrato, esta es la región de cinética de primer orden. A concentraciones altas de sustrato, la rapidez es prácticamente independiente de la concentración de sustrato, esta es la región de cinética de orden cero. A concentraciones intermedias de sustrato, la relación entre v y S sigue una cinética de orden variable (entre uno y cero).

2.3.2.1 Pruebas de diagnóstico

Como la curva de v en función de S es una hipérbola, es bastante difícil determinar V_{max} y, por lo tanto, la S que da la mitad de V_{max} (es decir K_m). Para facilitar la determinación de las constantes cinéticas, los datos se representan generalmente en una de las formas lineales descritas a continuación.

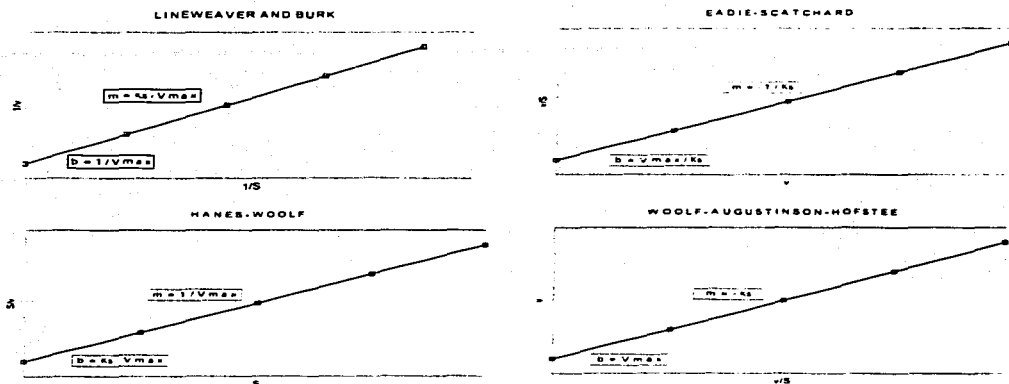


Figura 2.4 Métodos de obtención de las constantes de Michaelis y Menten

2.3.2.1.1 Representación de Lineweaver-Burk: $1/v$ en función de $1/S$

Esta representación se basa en la restructuración de la ecuación de Michaelis-Menten en una forma lineal ($y = mx + b$). La ecuación que se obtiene es la siguiente:

$$\frac{1}{v} = \left[\frac{K_m}{V_{max}} \right] \left[\frac{1}{S} \right] + \frac{1}{V_{max}} \quad (2.19)$$

En la representación de $1/v$ en función a $1/S$, la pendiente es K_m/V_{max} y la intersección con el eje de las ordenadas es $1/V_{max}$. También se puede ver que cuando $1/v = 0$, $(K_m/V_{max}) \times (1/S)$ es igual a $-1/V_{max}$ y, por lo tanto, $1/S$ es igual a $-1/K_m$. Así, la intersección con el eje de $1/S$ es $-1/K_m$. La representación de Lineweaver – Burk se muestra en la figura 2.4.

La linealización de Lineweaver y Burk es el método de diagnóstico más utilizado. Sin embargo, la utilización de este método presenta las siguientes desventajas:

- Incrementos iguales en S, los cuales dan puntos equidistantes en la representación de v en función de S, no dan puntos equidistantes en la representación inversa. Por ejemplo, los valores relativos de S de 1, 2, 3,10, etc., darán valores inversos que tienden a agruparse cerca del eje 1/v. Así habrá relativamente pocos puntos en el extremo final de la escala 1/S y son estos puntos los más importantes en el ajuste visual subjetivo de la recta.
- Errores pequeños en la determinación de v se incrementan cuando se toman los inversos. Los errores en la determinación de v son mas importantes a bajas concentraciones de sustrato (y a bajos valores de v) (Segel, 1982).

2.3.2.1.2 Representación de Hanes–Wolf: S/v en función de S

La ecuación de Lineweaver–Burk puede reestructurarse para dar la ecuación lineal de la representación de Hanes-Woolf:

$$\frac{1}{v} = \left[\frac{K_m}{v_{\max}} \right] \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{\max}}$$

Multiplicando ambos miembros de la ecuación por S:

$$\frac{S}{v} = \left[\frac{K_m}{v_{\max}} \right] \frac{S}{[S]} + \frac{S}{v_{\max}}$$

ó

$$\frac{S}{v} = \left[\frac{1}{v_{\max}} \right] [S] + \frac{K_m}{v_{\max}}$$

(2.20)

TESIS CON
FALLA DE ORDEN

De esta forma, la representación de S/v en función de S es una recta con una pendiente de $1/V_{\max}$. La intersección con el eje S/v da K_m/V_{\max} . Cuando $S/v = 0$, la intersección con el eje S da $-K_m$.

En esta representación es importante la elección del intervalo de concentración de sustrato. Si éste es muy bajo comparado con K_m , la representación será aproximadamente horizontal. Si el intervalo de concentración de sustrato es muy alto comparado con K_m , la representación cortará a los ejes muy cerca del origen. La representación de Hanes – Woolf se muestra en la figura 2.4.

2.3.2.1.3 Representación de Woolf–Augustinsson–Hofstee: v en función de v/S

Otra forma lineal se obtiene mediante la reestructuración de la ecuación básica de velocidad como se muestra a continuación.

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

Dividiendo el numerador y el denominador entre S :

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

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

$$v = V_{\max} - \frac{v K_m}{S}$$

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

(2.21)

TESIS CON
FALLA DE CUBIERTA

La representación de v en función de v/S es una recta con pendiente igual a $-K_m$. La intersección con el eje v da V_{max} . Cuando $v = 0$, la intersección con el eje v/S da V_{max}/K_m . Si el intervalo de concentración de sustrato es muy bajo comparado con K_m , la curva tendrá una pendiente muy grande, aproximándose a una recta vertical que corta al horizontal en V_{max}/K_m . Si el intervalo de concentración de sustrato es muy alto comparado con K_m , la representación será cercana a la horizontal a una altura igual a V_{max} por encima del eje v/S . La representación de Woolf–Augustinsson–Hofstee se muestra en la figura 2.4.

2.3.2.1.4 Representación de Eadie–Scatchard: v / S en función de v

Si la ecuación de Henri–Michaelis–Menten se reestructurara como se describió antes para la representación de v en función de v / S , se obtiene:

$$V_{max} = \frac{v K_m}{[S]} + v \quad (2.22)$$

Dividiendo ambos miembros de la ecuación entre K_m :

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

o

$$\frac{v}{S} = -\frac{1}{K_m} v + \frac{V_{max}}{K_m} \quad (2.23)$$

La representación de v/S en función de v es una línea recta con una pendiente de $-1/K_m$ y una intersección de V_{max}/K_m en el eje de v/S . Cuando $v/S = 0$, la intersección con el eje v da V_{max} . La representación de Eadie–Scatchard se muestra en la figura 2.4.

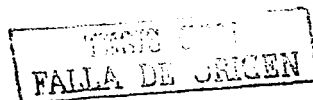
2.4 Enzimas alostéricas

En las células *in vivo*, las enzimas no exhiben necesariamente el comportamiento cinético clásico tipo Michaelis y Menten, por lo que es necesario analizar los factores que ejercen influencia sobre el proceso para describir mecanismos alternos que permitan obtener un modelo adecuado (Lehninger, 1976).

La cinética clásica de Michaelis y Menten, asume que las enzimas tienen múltiples, pero independientes, sitios de unión al sustrato; tales enzimas dan curvas hiperbólicas normales de velocidad. Sin embargo, si la unión de una molécula de un ligando determinado (sustrato, S, inhibidor, I o activador, A) provoca cambios electrónicos o estructurales que den por resultado que las afinidades por los sitios vacantes se alteren, la curva de velocidad no se ajustará a la cinética de Michaelis y Menten y la enzima se clasificará como una enzima alostérica (Segel, 1975). Este es el caso que se presenta con mayor frecuencia en los sistemas bioquímicos (Cadenas, 1978).

Dixon (1979) menciona que el término alostérico se utilizó originalmente por Monod, Changeux y Jacob en 1963, para explicar el fenómeno de inhibición competitiva. Estos investigadores denominaron isostérico al inhibidor con forma análoga al sustrato (inhibición competitiva clásica), mientras que el inhibidor que no se parece al sustrato se denominó alostérico.

Trevor (1985) menciona que el término inhibición alostérica se reservó para el mecanismo en el cual el inhibidor, más que formar un complejo con la enzima (modulación no alostérica), influencia cambios conformacionales, los cuales pueden alterar las características de unión de la enzima por el sustrato o las características de reacción subsecuentes. Posteriormente, se introdujo el término efector o modulador alostérico para describir inhibidores o activadores que presenten este último mecanismo.



2.4.1 Estructura y función

Las enzimas alostéricas son proteínas, oligómeros, constituidas por la agregación de un conjunto de subunidades, las cuales se denominan monómeros (Cadenas, 1978).

El término alostérico denota otro espacio, otra estructura, por lo tanto, las enzimas alostéricas tienen además del sitio catalítico otro(s) espacio(s) con el cual el ligando se une reversible y no covalentemente. En la figura 2.5 se observa un diagrama esquemático de una proteína alostérica con dos sitios cooperativos.

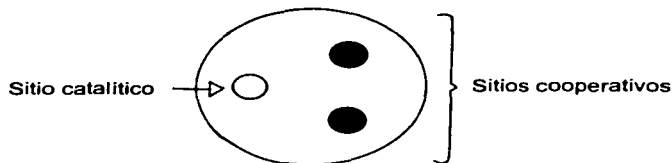


Fig. 2.5 Diagrama esquemático de una proteína alostérica con dos sitios cooperativos

En general, el sitio alostérico es específico para la unión del modulador o efector (activador o inhibidor) así como el sitio catalítico para la unión del sustrato (Segel, 1975). La unión con el sustrato hace posible la reacción enzimática, por otro lado, la unión con los moduladores regula la actividad de la enzima (Cadenas, 1978).

2.4.2 Mecanismos alostéricos

En ausencia de ligando, todas las moléculas de la macromolécula enzimática que presenta comportamiento alostérico, M , se encuentran en una misma forma con todos los centros libres. A medida que crece la concentración del ligando se van ocupando progresivamente más centros de unión en una mayor proporción de moléculas de M . Surge así, una variedad de formas de la macromolécula, en que

distinto número de sus centros se hayan ocupados. Naturalmente, al crecer la concentración de ligando aumenta la proporción de formas con mayor número de centros ocupados (Cadenas, 1978).

En la figura 2.6 se muestran las posibles combinaciones de M con tres centros de unión por molécula. Una macromolécula con esta característica presenta ocho variantes: con todos los centros libres u ocupados sólo hay una variante, en cambio, son tres las variantes tanto para la forma con un centro ocupado como para la que tiene dos.

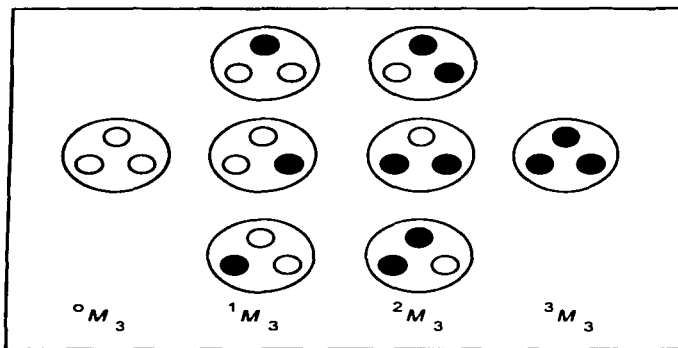


Figura 2.6 Representación simbólica de las cuatro formas de una macromolécula con tres centros de unión equivalentes por molécula. Los círculos blancos son centros libres, los círculos negros son centros ocupados. En la notación iM_y , M es la macromolécula enzimática alostérica, i número de centros ocupados y y es el número de centros para el ligando (tomado de Cadenas, 1978).

La unión de un ligando con un centro influye sobre la unión del ligando con otro centro, de tal forma que el que un centro esté ocupado facilita o dificulta la ocupación de otro, observándose efectos progresivos y acumulativos. Esta característica, denominada como cooperatividad, se pone de manifiesto en la existencia de una serie de valores discretos para la constante de equilibrio de la

reacción de asociación con el ligando, dependiendo de cuantos de los demás centros de unión para el ligando se encuentren ya ocupados por moléculas de ligando (Cadenas, 1978).

2.4.3 Tipos de efectos cooperativos

Los efectos cooperativos pueden ser positivos o negativos. La cooperatividad positiva o activación ocurre cuando la unión de una molécula de ligando incrementa la afinidad de la proteína por otras moléculas del mismo o diferente ligando.

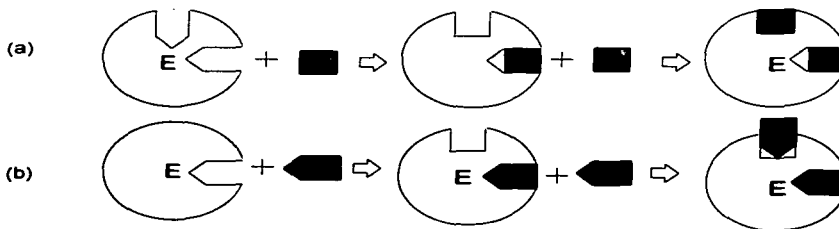


Figura 2.7 Efectos cooperativos (a) Positivos (b) Negativos

La cooperatividad negativa o inhibición ocurre cuando la unión de una molécula de ligando disminuye la afinidad de la proteína por otras moléculas del mismo o diferente ligando (Trevor, 1985). La figura 2.7 muestra de manera esquemática estos tipos de cooperatividad.

A manera de ejemplo, se describe el caso más simple, es decir, el de un dímero que presenta cooperatividad positiva. En este caso existen dos sitios de unión para el ligando idéntico, cuando el ligando se une a uno, se incrementa la afinidad de la proteína por el ligando en el otro sitio. La secuencia de reacción es la siguiente (Trevor, 1985).



2.4.4 Significado biológico del comportamiento alostérico

Todos los organismos requieren un elevado grado de control en sus procesos metabólicos. Las leyes ordinarias de la cinética enzimática son inadecuadas para proporcionar este control. La principal función fisiológica de las enzimas alostéricas es proporcionar el control necesario en reacciones bioquímicas, a través de su capacidad de responder con extrema sensibilidad a cambios en la concentración de metabolitos (Cornish-Bowden, 1976). La respuesta alostérica es comprensible en términos de control metabólico y de economía celular (Segel, 1975).

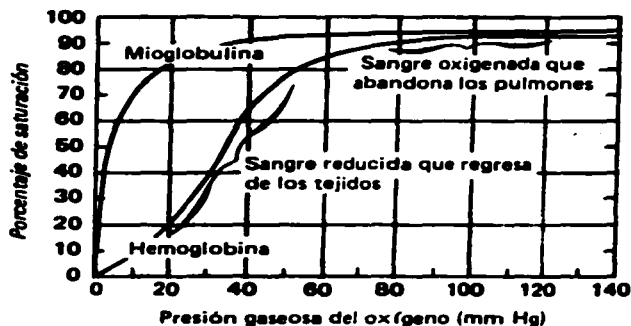


Figura 2.8 Curvas de equilibrio de oxígeno de la hemoglobina y la mioglobina (tomado de Martin, 1986)

El efecto fisiológico de la cooperatividad se ha estudiado mas ampliamente en la molécula de hemoglobina. En la figura 2.8 se muestra la curva típica del comportamiento de la hemoglobina y la mioglobina, ambas moléculas transportadoras de oxígeno. En esta figura se observa que la curva de disociación para el mioglobina es hiperbólica. La presión del oxígeno (PO_2) en el pulmón es de 100 torr; en la sangre venosa, de 40 torr y en los capilares del músculo activo, de 20 torr. La diferencia entre la PO_2 de la sangre en los pulmones y la de la sangre en los capilares del tejido muscular activo podría no ser suficiente para liberar más de aproximadamente 12 % de oxígeno que esta siendo transportado por la mioglobina. Debido a la afinidad relativamente alta de la mioglobina por el oxígeno y a la forma hiperbólica de la curva, solo podría liberarse el oxígeno disponible a los tejidos periféricos, cuando la PO_2 bajara a menos de 5 torr.

La mioglobina actua en el músculo rojo transportando el oxígeno absorbido de la sangre al interior de la mitocondria, donde la PO_2 es bastante baja. De este modo, la mioglobina, que actua en un lugar donde la PO_2 es del orden de 4-5 torr, puede descargar con eficiencia la mayor parte de su contenido de O_2 a la mitocondria.

Por otro lado, la hemoglobina en la sangre venosa pulmonar debe saturarse con O_2 a una PO_2 de 100 torr, pero descarga una cantidad significativa, si no la mayor parte, de este O_2 cuando llega a los tejidos periféricos, donde la PO_2 capilar no es menor de 20 torr. La hemoglobina debe recuperar un máximo de O_2 con un incremento limitado en la PO_2 (es decir a 100 torr) cuando regrese al pulmón. Estos requerimientos no pueden satisfacerse mediante una curva hiperbólica de disociación de oxígeno, sino que requieren una curva sigmoideal para este fenómeno.

Una curva sigmoideal de disociación de oxígeno requiere una interacción entre las porciones de los grupos hemo de la hemoglobina, por esta razón, esta molécula debe tener múltiples subunidades que interactúen cada una con su grupo hemo. La hemoglobina contiene 4 subunidades en interacción que generan un efecto

TRMIS
FALLA DE PLUMAS

cooperativo. Este efecto puede describirse de la manera siguiente: si una molécula de hemoglobina absorbe una de oxígeno, tiende a continuar el proceso y adquiere cuatro moléculas de oxígeno y si una molécula de hemoglobina saturada con oxígeno pierde un oxígeno por lo general desecha 2 ó 3 moléculas más. Así, por encima de la diferencia de valores de PO_2 entre la sangre de las venas pulmonares y la sangre de los capilares periféricos tisulares, la molécula de la hemoglobina libera 35 a 45% del oxígeno que acarrea. La mioglobina no puede generar este efecto cooperativo puesto que solo hay un grupo hemo por molécula de mioglobina, lo que imposibilita cualquier interacción indirecta hemo-hemo, como ocurre en la molécula tetramérica de la hemoglobina (Martín, 1986).

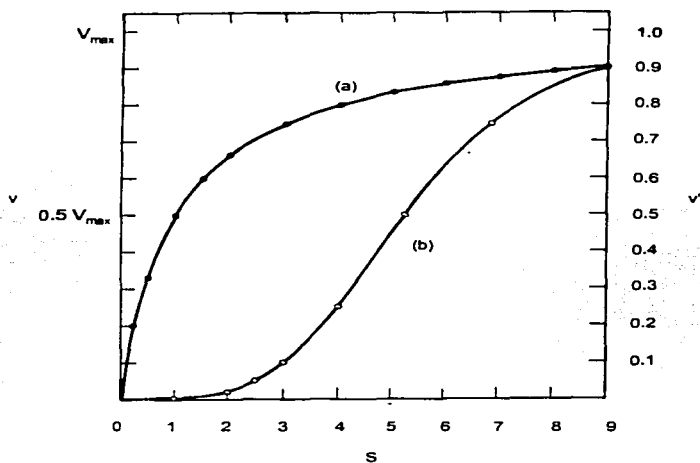


Figura 2.9 Comparación entre dos curvas de rapidez que presentan la misma v a $S = 9$.
a) Respuesta hiperbólica b) Respuesta sigmoide (Segel, 1975)

La cooperatividad positiva, en la representación de v en función de S , se muestra en la figura 2.9. En esta figura se comparan dos curvas de rapidez, hiperbólica y

sigmoideal, que presentan la misma v a $S = 9$. Entre $S=0$ y $S=3$, la respuesta de la curva hiperbólica muestra una tendencia hacia la desaceleración en la parte final del intervalo mencionado, pero llega a alcanzar 0.75 de V_{max} ; entre estos mismos límites, la curva sigmoideal acelera exponencialmente pero sólo alcanza 0.10 de V_{max} . Esto se debe a que a concentraciones bajas de sustrato, el efector alostérico regula eficientemente la velocidad de las reacciones. De este modo, la regulación es más estricta en el momento en que la necesidad es máxima, es decir, cuando la concentración intracelular de sustratos es baja (Rodwell, 1986). Sin embargo, esta curva con solo un incremento adicional de 2.3 en S , aumenta de 0.10 de V_{max} hasta 0.75 de V_{max} , lo cual significa que cuando la concentración del sustrato se eleva, el grado de regulación disminuye y se forma una mayor cantidad de producto.

A fin de cubrir el mismo intervalo de rapidez, la curva hiperbólica necesita un aumento en S de 27 veces. De esta manera, la respuesta sigmoideal actúa como un interruptor de encendido-apagado (Segel, 1975).

La cooperatividad negativa, en la representación de v en función de S , se muestra en la figura 2.10. En este caso, la unión de las moléculas de sustrato disminuye las afinidades intrínsecas de los sitios vacantes. Por ejemplo, si se considera una enzima con cuatro sitios activos y sus correspondientes constantes de disociación, k_s , y si se supone que la unión de cada una de las moléculas de sustrato incrementa la k_s de los sitios vacantes por un factor de 2, la curva de velocidad (figura 2.10) que se obtendrá presentará un incremento rápido en la velocidad a bajas concentraciones de sustrato, pero la pendiente empezará a disminuir marcadamente conforme la afinidad de los sitios vacantes decrece.

Fisiológicamente, la enzima que presenta cooperatividad negativa responde, en intervalos bajos de sustrato, casi normalmente a variaciones de S , pero exhibe una marcada inhibición por sustrato a altas concentraciones de éste.

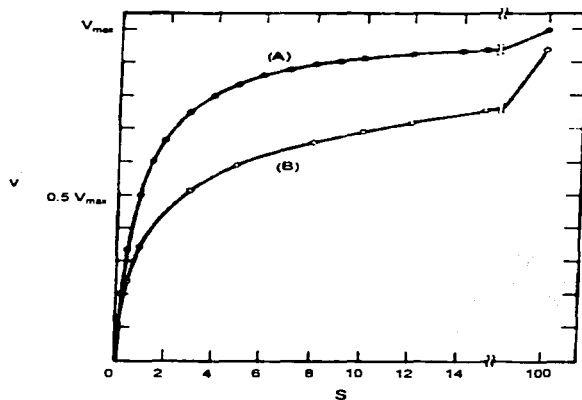


Figura 2.10 Comparación entre dos curvas de rapidez para una enzima tetramérica.
 (A) Enzima no alostérica. (B) Enzima alostérica con cooperatividad negativa (Segel, 1975)

Los fenómenos alostéricos son muy importantes en mecanismos de inhibición por producto final o retroalimentación y en mecanismos de activación.

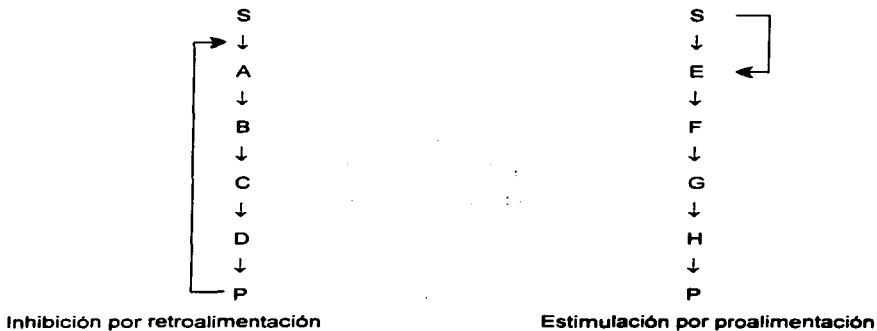


Fig. 2.11 Patrones de modulación alostérica (Lehninger, 1976)

TESIS CON
 FALLA DE REGISTRO

En la figura 2.11 se observa que en los mecanismos por retroalimentación, la primer enzima de la secuencia actúa como regulador alostérico de la rapidez de todo el sistema. Esta enzima se inhibe habitualmente por el producto final de la secuencia, de modo, que siempre que esta se acumula por encima de una concentración crítica, el producto la inhibe interrumpiendo la vía metabólica (Lehninger, 1976).

En algunos casos el precursor puede actuar como modulador alostérico positivo y estimular la primera reacción, de la forma que se indica en la figura 2.11.

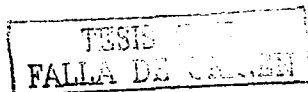
2.4.5 Modelación y procesos alostéricos

La cinética de las proteínas alostéricas es inusualmente compleja. El modelo ideal para describir este comportamiento debería expresar los mecanismos cinéticos de estas proteínas en pocas constantes simples. Sin embargo, la evidencia demuestra que no existe un modelo simple que explique el comportamiento alostérico (Koshland, 1976).

Los tipos de modelos para explicar los mecanismos alostéricos son de interacción secuencial y de simetría concertada (Segel, 1975), los cuales se basan en la teoría del ajuste inducido propuesta por Koshland.

La teoría del ajuste inducido postula que el sitio activo no necesita ser una cavidad geométrica rígida preexistente, sino una disposición espacial precisa y específica de grupos R de aminoácidos que se induce mediante el contacto con el sustrato (Segel, 1982).

Cuando el centro activo está libre los grupos funcionales situados en este centro no se encuentran en sus posiciones óptimas para promover la catálisis, pero cuando la molécula de sustrato se une a la enzima la afinidad de enlace obliga a las moléculas de la enzima a adoptar una conformación en la que los grupos

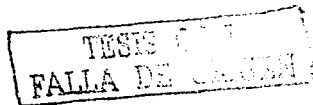


catalíticos adquieren una posición geométrica favorable para formar un estado de transición, es decir, se produce un ajuste inducido. La molécula enzimática es inestable en esta conformación activa y tiende a revertir a la forma libre en ausencia de sustrato (Lehninger, 1976).

La teoría de Koshland tiene importantes consecuencias en varias ramas de la enzimología, pero es particularmente importante para el entendimiento del fenómeno alostérico, ya que proporciona una explicación a las interacciones a intervalos grandes. En esta teoría una proteína combina rigidez con flexibilidad en una forma controlada e intencional, de esta manera, un sustrato que induce un cambio conformacional en un punto en una molécula puede comunicarse varios nanómetros a cualquier otro punto (Cornish-Bowden y Koshland, 1970). Los modelos alostéricos actuales, de simetría concertada y secuencial, se derivan de esta teoría.

Dixon (1979) señala que en 1966, Koshland y Atkinson basándose en la teoría de ajuste inducido de Koshland, propusieron el modelo actual de interacción secuencial, el cual se basa en el principio de que si la unión de un ligando induce un cambio conformacional en una subunidad, se puede cambiar la estabilidad conformacional de las subunidades vecinas en varios grados. Este mecanismo conlleva a la existencia de varios estados conformacionales híbridos, de tal forma, que las subunidades individuales existen en varias estructuras conformacionales en una proteína en valores de saturación fraccional. Esta teoría se denominó como secuencial considerando que las subunidades pueden cambiar su conformación secuencialmente conforme el ligando se va uniendo.

El modelo de simetría concertada asume que la enzima preexiste como una mezcla en equilibrio de oligómero de alta y baja afinidad. Los ligandos, incluido el sustrato, actúan desplazando el equilibrio en favor de uno u otro estado. Durante la transición la conformación de todas las subunidades cambia al mismo tiempo y el oligómero retiene su simetría (Segel, 1975). Una las características mas



importantes del modelo, es que se presentan pocos estados finales (Koshland y col, 1968).

2.4.6 Pruebas de diagnóstico

Las principales pruebas para determinar el número de sitios de unión de la enzima alostérica, son las de Lineweaver y Burk y Hill.

2.4.6.1. Representación de Lineweaver y Burk

La utilización de este método permite estimar los valores de n (número de sitios de unión) y de V_{\max} .

Este método consiste en graficar el inverso de v en función del inverso de S , elevando esta última variable a varias potencias. El valor de n es igual a la potencia que rinde una línea recta con el mejor coeficiente de correlación, el valor de V_{\max} es igual al inverso del valor de la ordenada al origen.

2.4.6.2. Representación de Hill

El modelo de Hill se utilizó para describir el mecanismo cooperativo que presenta la hemoglobina. La ecuación es la siguiente:

$$\frac{v}{V_{\max}} = \frac{[S]^n}{K_s + [S]^n} \quad (2.26)$$

La constante K_s corresponde a la constante de disociación global de reacción, la cual ya no es igual a la concentración de sustrato que produce una la mitad de la velocidad máxima, excepto cuando n es igual a 1 (Segel, 1975).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El valor de n corresponde al número de sitios de unión de la enzima. En caso de existir solamente un solo sitio de unión o sitios de unión independientes, H debe ser igual a 1 y la ecuación 2.26 se reduce al modelo de Michaelis y Menten.

La ecuación de Hill puede convertirse en una forma lineal útil, como se muestra a continuación:

$$\frac{v}{v_{\max}} = \frac{[S]^n}{K_s + [S]^n}$$

$$v_{\max} [S]^n = vK_s + v[S]^n$$

$$[S]^n (v_{\max} - v) = vK_s$$

$$\frac{[S]^n (v_{\max} - v)}{v} = K_s$$

$$n \log [S] + \log \frac{(v_{\max} - v)}{v} = \log K_s$$

$$\log \frac{(v_{\max} - v)}{v} = \log K_s - n \log [S]$$

$$\log \frac{v}{v_{\max} - v} = n \log [S] - \log K_s \quad (2.27)$$

De esta forma, la representación del log de $v/(v_{\max}-v)$ en función del log de S , es una línea recta con una pendiente igual a n . Esta representación se muestra en la figura 2.12.

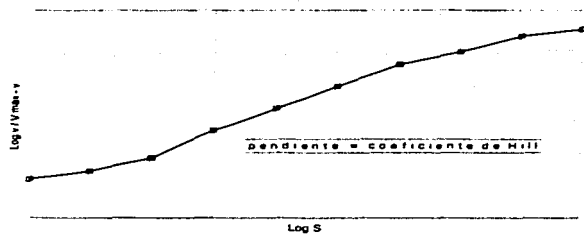


Figura 2.12 Representación del método de Hill para una proteína con cooperatividad positiva (Tomado de Trevor, 1985).

El valor de n debe considerarse a la pendiente en la parte lineal y central de la gráfica, donde se expresan más fuertemente los efectos cooperativos (Trevor, 1985).

3. MÉTODOS

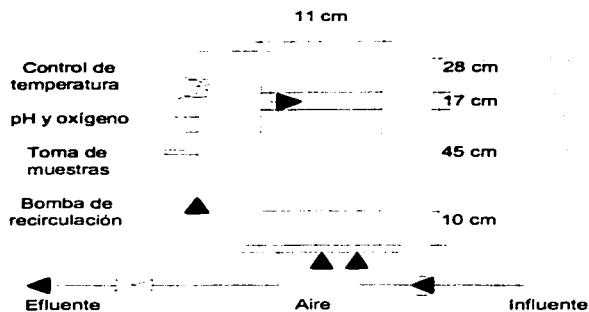
El análisis cinético teórico se hizo con base en los resultados de consumo de fósforo en función del tiempo reportados por González-Martínez (1989). La descripción de las condiciones bajo las cuales se generó esta información se definen a continuación.

3.1 Descripción del reactor

La figura 3.1 muestra las características principales del reactor, el cual fue un cilindro de acrílico, abierto en la parte superior. Como material de soporte para la biopelícula se utilizaron anillos cilíndricos, diseñados especialmente para tratamiento de aguas residuales.

3.2 Operación del reactor

El reactor operó con un procedimiento de llenado-vaciado. El ciclo se dividió en cuatro fases:



Volumen de líquido (sin biopelícula)	6,670 ml
Volumen de líquido (con biopelícula)	5,500 ml
Area superficial total	11,940 cm ²
Area superficial específica	175 m ² /m ³
Recirculación	1,000 ml/min

Figura 3.1 Reactor batch utilizado a nivel laboratorio

- **Llenado.** La duración de esta fase fue de 10 minutos. La alimentación del reactor se hizo con agua la cual básicamente contenía glucosa, peptona, acetato de sodio, nutrientes y metales en cantidades traza.
- **Fase anaerobia.** La característica principal de esta fase fue la ausencia de oxígeno disuelto, nitritos y nitratos. El mezclado se realizó a través de un proceso continuo de recirculación del agua que contenía el reactor. La duración de esta fase fue variable, como se muestra en la tabla 3.1.
- **Fase aerobia.** Durante esta fase se proporcionó oxigenación y mezclado, esto se logró bombeando aire desde la parte inferior del reactor, lo cual permitió que las burbujas pasaran a través del material de empaque. Los tiempos de duración de esta fase se indican en la tabla 3.1.

TESTE
FALLA

- **Vaciado.** Una vez terminada la fase aerobia se inició la fase de vaciado, la cual duró aproximadamente 5 minutos.

Operando con las fases descritas, se obtuvieron resultados variando duración del ciclo, temperatura y reacción a sustratos puros. La realización del análisis cinético teórico se basó en los resultados obtenidos variando la duración del ciclo y de las fases, ya que estos resultados cuentan con mayor información experimental. Las corridas experimentales que se realizaron, combinando las dos variables mencionadas, se muestran en la tabla 3.1.

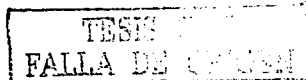
Tabla 3.1 Combinaciones de duración del ciclo y duración de las fases aerobia y anaerobia

Duración del ciclo (h)	Duración de la fase anaerobia (%)		
6	30	45	63
8	25	45	63
12	25	45	63

Después de cada cambio en las condiciones de operación, el sistema fue operado durante dos semanas para permitir la estabilización de las comunidades microbianas. En la tercera semana se realizó el muestreo; las muestras se tomaron cada treinta minutos y se realizaron los siguientes análisis fisicoquímicos: demanda química de oxígeno (DQO), fósforo de fosfatos ($P-PO_4^{3-}$), nitrógeno de amoníaco ($N-NH_4^+$), de nitritos ($N-NO_2^-$) y de nitratos ($N-NO_3^-$). Los experimentos se hicieron a temperatura ambiente. El pH y el oxígeno disuelto se monitorearon continuamente. Los resultados se muestran en el apéndice.

3.3 Análisis cinético

A partir de los resultados experimentales, obtenidos bajo las condiciones descritas en los capítulos 3.1 y 3.2, se generó la información básica para la realización del análisis cinético, (valores de concentración inicial de $P-PO_4^{3-}$ (S) y de rapidez inicial de consumo de sustrato (v)).



En la primera etapa del trabajo, los valores de S se obtuvieron directamente de la información experimental, mientras que los valores de v se obtuvieron calculando la pendiente entre la primera y la segunda determinación experimental de $P-PO_4^{3-}$, una vez iniciada la fase aerobia. Cabe señalar que esta última determinación en algunos casos excedía el 10 % de consumo de S. Interrelacionando los valores de S y v de todas las corridas se encontró una baja correlación, por lo que se realizó una depuración de los datos experimentales; al identificar valores que evidenciaban errores en la medición. Los datos que se descartaron fueron concentraciones de $P-PO_4^{3-}$ que se salían del patrón de comportamiento descrito en el capítulo 2.2.1; básicamente valores de concentración mayores a los datos previos anteriores y valores de concentración menores a las concentraciones subsecuentes.

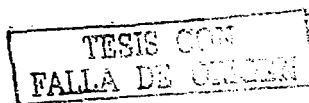
Este nuevo conjunto de datos se correlacionó empleando funciones matemáticas, a partir de las cuales mediante interpolación se obtuvo el tiempo correspondiente para un consumo máximo de 10 % de sustrato, condición crítica para la realización de análisis cinéticos.

Inicialmente se utilizaron funciones potenciales y exponenciales, obteniéndose resultados poco satisfactorios por presentarse una alta desviación con respecto a los valores teóricos, por esta razón y considerando la distribución de los datos, se optó por recurrir a una expresión matemática sencilla y flexible, seleccionándose una función polinomial. En general, este tipo de funciones presenta la forma que se muestra en la ecuación 3.1.

$$y = C_1x^n + C_2x^{n-1} + C_0 \quad (3.1)$$

donde:

x	variable independiente (tiempo)
y	variable dependiente (concentración de sustrato, $P-PO_4^{3-}$)
n	grado del polinomio
C_1, C_2, C_0	coeficientes del polinomio



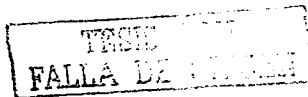
La obtención de los coeficientes indicados en esta función se realizó utilizando el paquete matemático Matlab. Los resultados experimentales se ajustaron utilizando polinomios desde primero hasta sexto grado. La selección del polinomio que mejor se ajustó al proceso se basó en los parámetros estadísticos: valor significativo para la prueba "t" de student, coeficiente de correlación y error estándar.

Los valores de v se obtuvieron con base en la información experimental ajustada. El procedimiento que se siguió se describe a continuación:

- a) Determinación de la concentración de S cuando se consumió de 5 a 10 % de la concentración total removida de S . Se consideraron estos porcentajes con el objetivo de que la disminución de S fuera mínima (ver capítulo 2.3.2).
- b) Obtención del tiempo en el que se consume de 5 a 10 % de la concentración total removida de S . La determinación del tiempo correspondiente a estos porcentajes de S se determinó igualando las funciones polinomiales a los valores de concentración obtenidos en el punto a). Las raíces de estas funciones corresponden a los valores de t .
- c) Obtención de v . Los valores de v se obtuvieron sustituyendo los valores de S y t (para los porcentajes de remoción indicados), en las derivadas de los polinomios correspondientes. Estas ecuaciones representan la rapidez de consumo de S dado que :

$$\frac{dS}{dt} = \frac{mg/l}{h} = v$$

- d) Obtención del coeficiente de correlación entre los valores de t y S . Partiendo del tiempo inicial de la fase aerobia para cada corrida, se dieron incrementos en t de 0.01 unidades hasta alcanzar el valor obtenido en b). Los valores de t y



los de S correspondientes a los tiempos mencionados se correlacionaron mediante un análisis de regresión.

3.3.1 Aplicación del modelo clásico de Michaelis y Menten

La determinación de las constantes involucradas en el modelo de Michaelis y Menten, K_m y V_{max} , se hizo con base en los métodos propuestos por Lineweaver y Burk, Hanes-Woolf, Woolf-Augustinsson-Hofstee y Eadie-Scatchard. En el capítulo 2.3.2.1 se realizó una descripción de estos métodos.

3.3.2 Aplicación del modelo alostérico

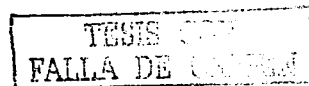
La factibilidad de aplicar el modelo alostérico al proceso de remoción de fósforo se basó en las pruebas de diagnóstico propuestas por Hill y Lineweaver y Burk. La aplicación de estas pruebas permitió conocer el número de sitios de unión de la enzima o complejo enzimático que participa en la fase aerobia del proceso biológico para remoción de fósforo y la rapidez máxima de este. En el capítulo 2.4.6 se realizó una descripción de los pruebas mencionadas.

3.3.2.1 Definición del modelo

La definición de modelo catalítico se realizó siguiendo el procedimiento reportado por Cadenas (1978). La obtención del modelo parte de la determinación de las concentraciones de las formas enzimáticas presentes y de la determinación de las formas eficientes en la catálisis.

a) Determinación de las concentraciones de las formas enzimáticas presentes

La metodología para conocer las concentraciones de las formas enzimáticas presentes fue la siguiente:



Obtención del número total de variantes. La obtención del número total de variantes para todas las formas de la macromolécula se hizo utilizando la ecuación 3.2:

$$\sum_{i=0}^Y = 2^Y \quad (3.2)$$

Determinación de las concentraciones de las formas enzimáticas presentes. La determinación de este parámetro se hizo con base en la obtención de la fracción molar para cada una de las formas enzimáticas. La fracción molar se define como la fracción que representa un compuesto, en este caso para cada forma iM_Y , con respecto al número total de moles presentes.

La obtención de la fracción molar de las diferentes formas enzimáticas parte de la consideración de que la concentración total de la macromolécula ΣM es igual a:

$$\Sigma M = \sum_{i=0}^Y iM_Y \quad (3.3)$$

Por lo que la fracción molar, iF_Y , para cada una de las formas iM_Y se puede definir como:

$$iF_Y = \frac{iM_Y}{\Sigma M} \quad (i=0,1,2,\dots,s) \quad (3.4)$$

Por lo tanto, la suma de todas las fracciones molares debe valer:

$$\sum_{i=0}^s iF_Y = 1 \quad (3.5)$$



Si se considera una macromolécula con y centros de unión, es razonable suponer que todas las variantes de una misma forma, i_{M_y} , por ser idénticas poseen la misma concentración, la cual se puede representar por i'_{M_y} . La relación entre la concentración de la forma i_{M_y} y la concentración de sus variantes i'_{M_y} es igual a:

$$i_{M_y} = i'_{M_y} \quad i_{M_y} = \binom{y}{i} i'_{M_y} \quad (3.6)$$

Por lo que la expresión 3.4 adopta la forma:

$$i_{F_y} = \frac{\binom{y}{i} i'_{M_y}}{\sum M} \quad (3.7)$$

La ecuación 3.7 muestra el grado de multiplicidad de cada forma debido a la existencia de diferentes variantes.

Con el fin de poner de manifiesto la relación que existe entre la concentración del ligando (S) y el valor de las fracciones molares, es preciso tomar en cuenta que la unión del ligando con su centro específico en la macromolécula se produce a través de la reacción reversible:



Una vez alcanzado el equilibrio en la reacción 3.8 se cumple que:

$${}^1k_y = \frac{{}^1M_y}{S {}^0M_y} \quad (3.9)$$

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

donde 1k_y es la constante de equilibrio de la reacción la cual se denomina constante de asociación intrínseca.

Tomando en cuenta la ecuación 3.9, la expresión 3.7 adopta la forma:

$$i_{F_y} = \binom{y}{i} \frac{^1k_y \cdot ^2k_y \dots i k_y S^i}{i_{P_x}} \quad (3.10)$$

donde i_{P_x} , polinomio de unión, es igual a:

$$i_{P_x} = \sum_{i=0}^y \binom{y}{i} ^1k_y \cdot ^2k_y \dots i k_y S^i \quad (3.11)$$

La expresión 3.10 permite conocer la concentración de todas las formas presentes.

b) Determinación de las formas eficientes en la catálisis

Las únicas formas catalíticamente activas son MS_x , su eficiencia catalítica se representa como k_{cat} , por lo tanto, las contribuciones a la catálisis están dadas por:

$$K_{cat-MS}$$

c) Definición del modelo catalítico

La metodología que se utilizó para definir el modelo catalítico se ejemplifica suponiendo el caso de una enzima con un centro de unión por molécula para su único sustrato. En consideración a las características de este ejemplo y a la nomenclatura anteriormente utilizada, se cambió la notación M por E.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El paso inicial consiste en dividir las contribuciones eficientes en la catálisis entre las sumas de las concentraciones de las formas enzimáticas presentes, de esta forma se obtiene la actividad molar de todas las formas enzimáticas presentes:

$$\frac{v}{E_t} = \frac{k_{cat} \cdot ES}{1 + k \cdot S} = \frac{k_{cat} \cdot k \cdot S}{1 + k \cdot S} \quad (3.12)$$

Multiplicando ambos miembros por E_t y haciendo la sustitución de:

$$k_{cat} \cdot E_t = V_{max} \quad (3.13)$$

Se obtiene la ecuación de rapidez para la reacción enzimática:

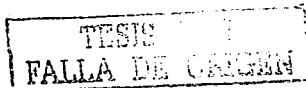
$$v = V_{max} \frac{k \cdot S}{1 + k \cdot S} \quad (3.14)$$

La ecuación 3.14 corresponde al modelo de Michaelis y Menten, la cual considera que, como se mencionó al inicio de este subcapítulo, la enzima presenta solamente un sitio de unión. La obtención de modelos para enzimas alostéricas que presenten dos o más sitios cooperativos se realiza de manera similar.

Si se tienen dos o más sitios de unión el valor de las constantes eficientes en la catálisis es igual al producto de V_{max} por un factor de efectividad catalítica, σ . La cooperatividad en la catálisis se estima a partir del valor de σ . Cuando $\sigma = 1$ no hay cooperatividad en la catálisis: un centro cataliza la reacción con la misma eficiencia si el otro está libre o si está ocupado. Si $\sigma > 1$ ó $\sigma < 1$, la eficiencia catalítica de un centro se exalta o disminuye cuando el otro está ocupado.

d) Obtención de los valores para las constantes intrínsecas y los factores de efectividad catalítica

La figura 3.2 muestra las cinco representaciones que se utilizaron para obtener los valores de las constantes intrínsecas y de los factores de efectividad catalítica.



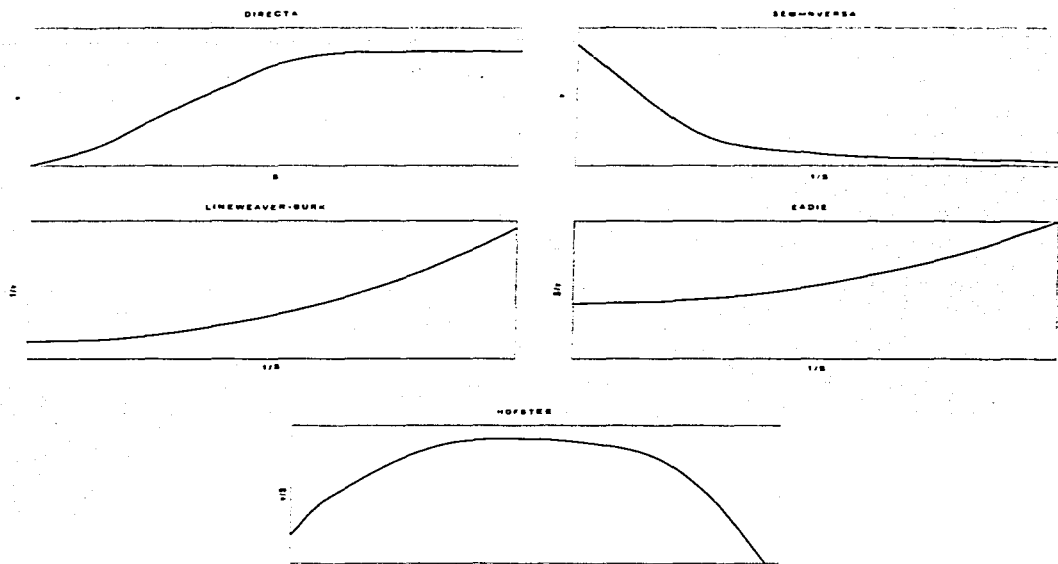


Figura 3.2 Representaciones utilizadas para la obtención de los diferentes parámetros involucrados en el modelo de rapidez

La obtención de las constantes involucró la siguiente metodología:

- 1) Reestructuración del modelo catalítico obtenido considerando las variables indicadas en las representaciones de la figura 3.2. En la representación directa el modelo no se modificó ya que los valores de las abscisas y los de las ordenadas corresponden a los valores de S y v , respectivamente.

La representación de Hofstee involucra dos formas del modelo: la obtenida relacionando en el modelo las variables indicadas en la figura 3.2 y la de la representación directa.

- 2) **Obtención de los límites de las ecuaciones obtenidas en 1) cuando S o 1/S (en el caso de las representaciones semiinversa y de Lineweaver y Burk), tienden a cero y a infinito.**
- 3) **Cálculo de las derivadas de las ecuaciones obtenidas en 1).**
- 4) **Obtención de los límites de las derivadas cuando S o 1/S (en el caso de las representaciones semiinversa y de Lineweaver y Burk), tienden a cero y a infinito. En la representación de Hofstee los límites se calculan cuando v y S tienden a los valores o ecuaciones que se indican en la tabla 3.2. En esta tabla se resumen las límites de cada representación que permiten obtener las ecuaciones a partir de las cuales, conociendo la interpretación de cada una estas (tercera columna de la tabla), se calcularon los valores de los parámetros involucrados en el modelo (ecuación 3.14).**

La información proporcionada por las diferentes representaciones es complementaria.

La metodología descrita se aplicó a los tres ciclos con los que se trabajó.

3.3.2.2 Validación del modelo

La validación del modelo se realizó comparando 7 conjuntos de datos experimentales (de $P-PO_4^{3-}$ en función del tiempo) no considerados durante la etapa de generación del modelo enzimático con valores teóricos obtenidos utilizando el modelo.

Los resultados experimentales fueron obtenidos por González-Martínez (información aún no publicada). Como se mencionó, las corridas disponibles fueron 7, 3 corridas para los ciclos de 6 y 8 horas y 1 corrida para el ciclo de 12 horas. Las condiciones experimentales (duración de ciclo y porcentaje de fase

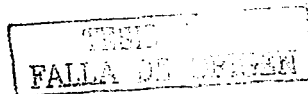
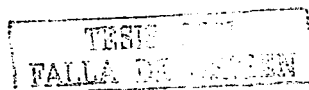


Tabla 3.2 Límites que permiten calcular los valores de las constantes involucradas en el modelo de rapidez para una enzima alostérica

Representación	Ecuación	Interpretación
Directa	$\lim v, S \rightarrow \infty$ $\lim \frac{dv}{dS}, S \rightarrow 0$	Asíntota paralela al eje de las abscisas Pendiente de la tangente en el origen
Semiinversa	$\lim v, \frac{1}{S} \rightarrow 0$ $\lim \frac{dv}{d(1/S)}, \frac{1}{S} \rightarrow 0$	Ordenada en el origen Pendiente en el origen
Lineaweaver y Burk	$\lim \frac{d(1/v)}{d(1/S)}, \frac{1}{S} \rightarrow 0$ $\lim \frac{d(1/v)}{d(1/S)}, \frac{1}{S} \rightarrow \infty$ $\lim \frac{1}{v}, \frac{1}{S} \rightarrow 0$	Pendiente de la tangente en el origen Pendiente de la tangente en el infinito Ordenada en el origen
Eadie	$\lim \frac{S}{v}, S \rightarrow 0$ $\lim \frac{d(S/v)}{d(S)}, S \rightarrow 0$ $\lim \frac{d(S/v)}{d(S)}, S \rightarrow \infty$	Ordenada en el origen Pendiente en el origen Pendiente en el infinito
Hofstee	$\lim \frac{v}{S}, S \rightarrow 0$ $\lim v, S \rightarrow \infty$ $\lim \frac{d\left[\frac{v}{S}\right]v}{d(v)}, v \rightarrow 0$ $\lim \frac{d\left[\frac{v}{S}\right]v}{d(v)}, v \rightarrow z^*$	Ordenada en el origen Abscisa en el origen Pendiente de la tangente en el origen Pendiente de la tangente en corte a las abscisas

El valor marcado como z^* corresponde al valor obtenido de la representación directa para el límite de v cuando S tiende a infinito



anaerobia) de esta nueva información, fueron similares a las establecidas en la información experimental utilizada para el cálculo de las constantes del modelo.

Los valores teóricos se obtuvieron por medio del modelo, para lo cual fue necesario realizar la integración de este, en función del tiempo. El paquete que se utilizó para resolver las ecuaciones integrales fue MathCAD 2.0. La integral se resolvió dando un intervalo de concentración, el cual consideró un mínimo de cero y un máximo igual a la concentración al inicio de la fase aerobia. Cabe señalar que el único dato que se alimenta en el modelo es el intervalo de concentración mencionado, a partir de esta información el modelo es capaz de calcular los perfiles de tiempo-concentración de $P-PO_4^{3-}$.

Se aplicó la prueba "t" de student para establecer si existían diferencias significativas entre valores teóricos y experimentales.

4. RESULTADOS Y ANÁLISIS

Inicialmente se intentó que los polinomios empleados para correlacionar todos los conjuntos de datos experimentales fueran del mismo grado, considerando que se trata del mismo proceso. Sin embargo, con base en los valores para los parámetros estadísticos: valor significativo para la prueba "t" de student, coeficiente de correlación y error estándar (tablas 10-12 del apéndice) se seleccionaron funciones polinomiales de tercer grado para los ciclos de 6 y 8h, mientras que para el ciclo de 12h se optó por una función polinomial de segundo grado.

Los resultados obtenidos con el ajuste polinomial, así como los valores experimentales (reportados en las tablas 1 a 9 del apéndice), se muestran en las figuras 4.1 a 4.9. En estas figuras solamente se graficó la fase aerobia del proceso de remoción biológica de fósforo, las curvas obtenidas utilizando las funciones polinomiales correspondientes (valores ajustados) se representaron con

líneas continuas, mientras que para los valores experimentales se usó el símbolo ■.

4.1 Análisis enzimático

4.1.1 Aplicación del modelo clásico de Michaelis y Menten

Los valores de concentración inicial de sustrato (S) y los de rapidez inicial de consumo de sustrato (v), requeridos para la obtención del modelo de Michaelis y Menten, se muestran en la tabla 4.1 y en las figuras 4.1 a 4.9. El coeficiente de correlación obtenido entre los valores de t y S (para consumos de sustrato máximos de 10 %) se observa también en la tabla y gráficas mencionadas. El desarrollo del procedimiento utilizado para la obtención de los valores de rapidez inicial de consumo de sustrato se muestra en el apéndice.

Tabla 4.1 Valores de rapidez inicial y concentración inicial

Duración del ciclo (h)	Duración de la fase anaerobia (h)	Concentración inicial de sustrato (mg P - PO ₄ ³⁻ / l)	Rapidez inicial (mg P - PO ₄ ³⁻ / l h)	Coefficiente de correlación para t y S
6	2	26.29	11.08	0.8721
	2.75	22.21	7.73	0.9440
	3.75	31.14	21.42	0.6425
8	2	16.84	4.68	0.9998
	3.5	25.39	12.92	0.9999
	5	15.02	4.57	0.9991
12	3	64.24	44.77	0.9997
	5.5	67.15	34.08	0.9997
	7.5	58.62	48.57	0.9975

2158
FALLA DE ORIGEN

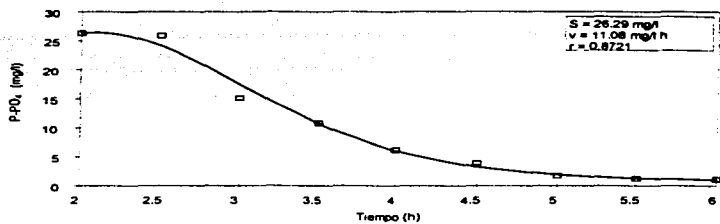


Figura 4.1 Valores experimentales y ajustados para la captura de $P - PO_4^{3-}$ para el ciclo de 6h
Duración de las fases: 30 % de fase anaerobia (2 h) y 70 % de fase aerobia (4 h)

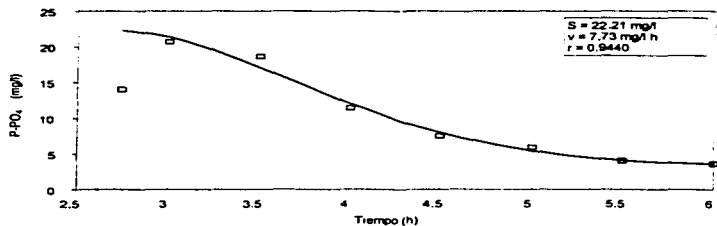


Figura 4.2 Valores experimentales y ajustados para la captura de $P - PO_4^{3-}$ para el ciclo de 6h
Duración de las fases: 45 % de fase anaerobia (2.5 h) y 55 % de fase aerobia (3.5 h)

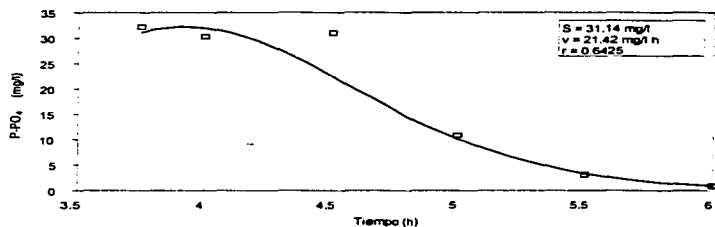


Figura 4.3 Valores experimentales y ajustados para la captura de $P - PO_4^{3-}$ para el ciclo de 6h
Duración de las fases: 63 % de fase anaerobia (3.5 h) y 37 % de fase aerobia (2.5 h)

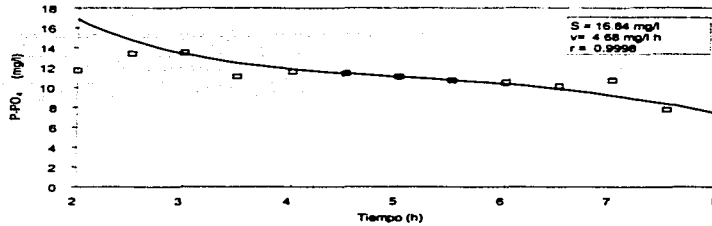


Figura 4.4 Valores experimentales y ajustados para la captura de $P - PO_4^{3-}$ para el ciclo de 8h
 Duración de las fases: 25 % de fase anaerobia (2 h) y 75 % de fase aerobia (6 h)

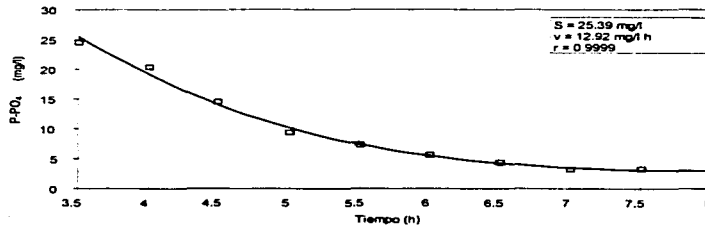


Figura 4.5 Valores experimentales y ajustados para la captura de $P - PO_4^{3-}$ para el ciclo de 8h
 Duración de las fases: 45 % de fase anaerobia (3.5 h) y 55 % de fase aerobia (4.5 h)

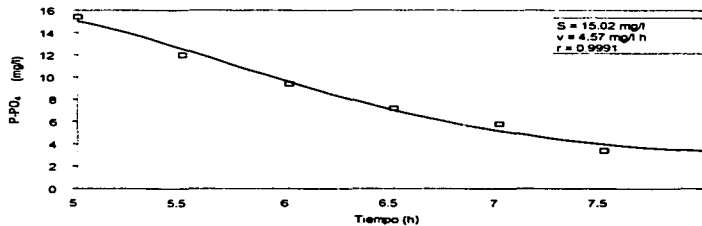


Figura 4.6 Valores experimentales y ajustados para la captura de $P - PO_4^{3-}$ para el ciclo de 8h
 Duración de las fases: 63 % de fase anaerobia (5 h) y 37 % de fase aerobia (3 h)

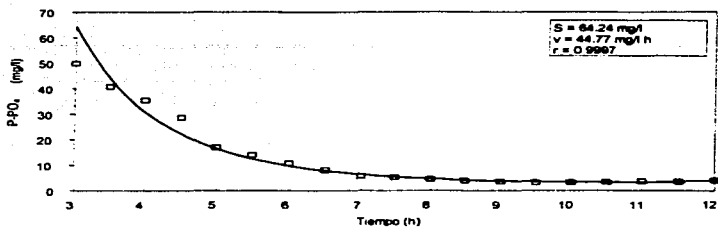


Figura 4.7 Valores experimentales y ajustados para la captura de $P - PO_4^{3-}$ para el ciclo de 12h
Duración de las fases: 25 % de fase anaerobia (3 h) y 75 % de fase aerobia (9 h)

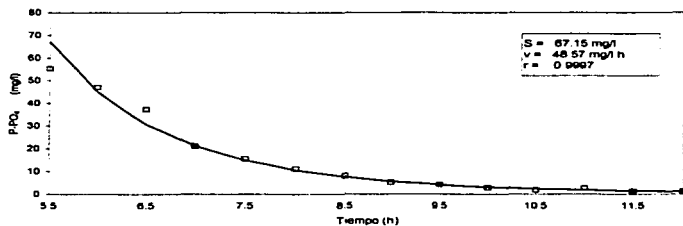


Figura 4.8 Valores experimentales y ajustados para la captura de $P - PO_4^{3-}$ para el ciclo de 12h
Duración de las fases: 45 % de fase anaerobia (5.5 h) y 55 % de fase aerobia (6.5 h)

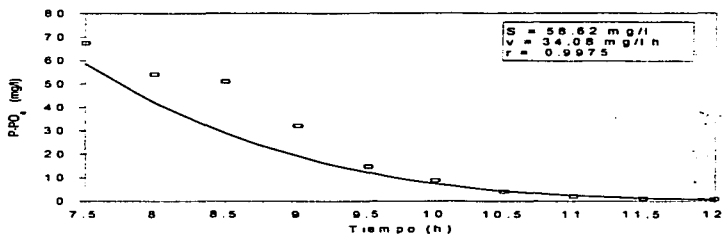


Figura 4.9 Valores experimentales y ajustados para la captura de $P - PO_4^{3-}$ para el ciclo de 12h
Duración de las fases: 63 % de fase anaerobia (7.5 h) y 37 % de fase aerobia (4.5 h)

TESIS
FALLA DE CALIBRE

Las figuras 4.10 a 4.12 muestran los resultados obtenidos al aplicar los métodos de Lineweaver-Burk, Hanes-Woolf, Woolf-Augustinson-Hofstee y Eadie-Scatchard. Con base en estos resultados, se obtuvieron los valores para las constantes de Michaelis y Menten, los cuales se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 4.2 Resultados obtenidos para las constantes de Michaelis y Menten

	Duración del ciclo (h)					
	6		8		12	
	K_m^*	V_{max}^{**}	K_m^*	V_{max}^{**}	K_m^*	V_{max}^{**}
Método utilizado						
Lineweaver y Burk	-41	-6	-40	-7	-98	-24
Hanes-Woolf	-40	-6	-39	-7	-100	-24
Woolf-Augustinson-Hofstee	-40	-6	-38	-6	-99	-24
Eadie-Scatchard	-40	-6	-38	-6	-100	-24

* mg P - PO_4^{3-} / l

** mg P - PO_4^{3-} / l h

En la tabla 4.2 se observa que los valores de las constantes V_{max} y K_m , calculados con los 4 métodos, son muy similares. Los valores negativos obtenidos para las constantes mencionadas demuestran que el proceso de remoción de fósforo no se ajusta al modelo clásico de Michaelis y Menten. Estos resultados no se esperaban dado que la mayoría de las reacciones catalizadas enzímicamente siguen el comportamiento descrito por la ecuación de Michaelis y Menten.

Con base en estos resultados se buscó un mecanismo enzimático alternativo que pudiera describir el comportamiento de este proceso. En las figuras 4.1, 4.2 y 4.3 se observa un comportamiento sigmoidal. Con el fin de descartar que este comportamiento fuera resultado de alguna influencia exógena, se analizó el efecto de la materia orgánica e inorgánica residual, del oxígeno disuelto y del amonio.

TESIS DE
FALLA DE ORIGEN

CICLO DE 6 HORAS

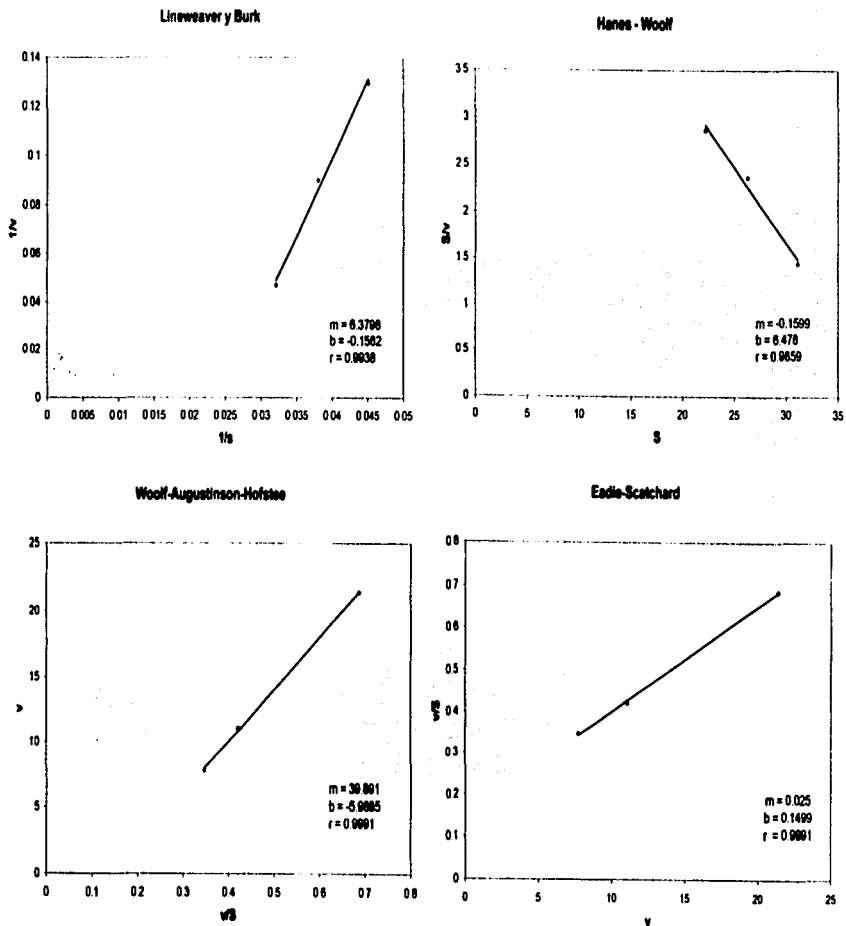


Figura 4.10 Resultados de los métodos para la obtención de constantes cinéticas K_m y V_{max}

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

CICLO DE 8 HORAS

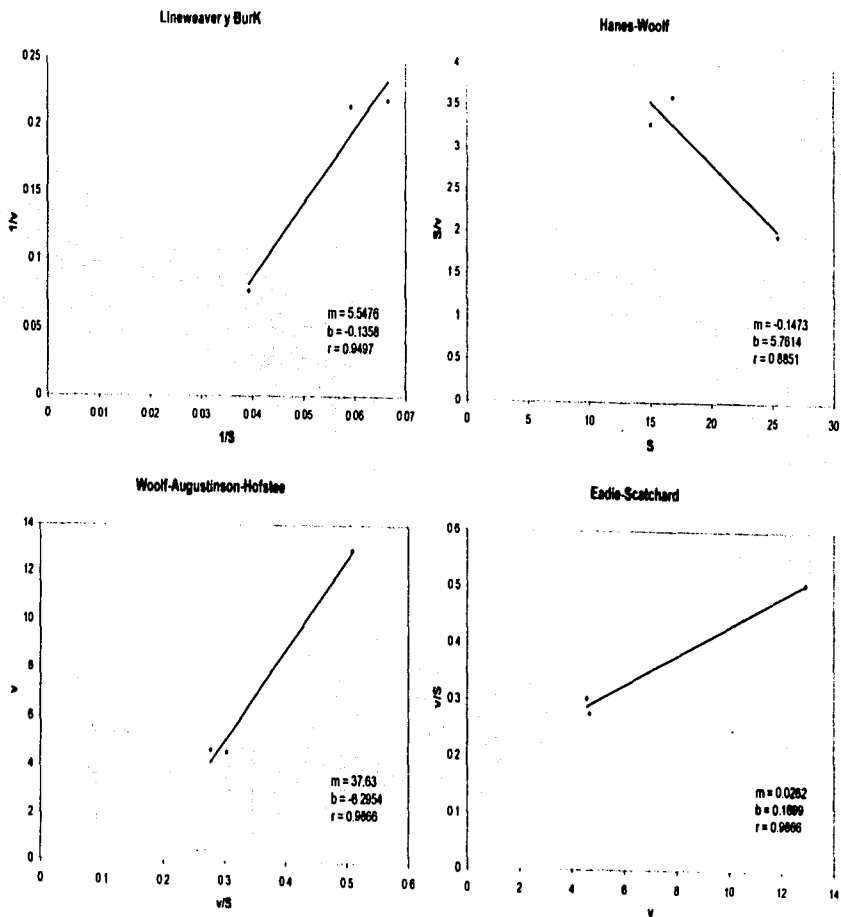
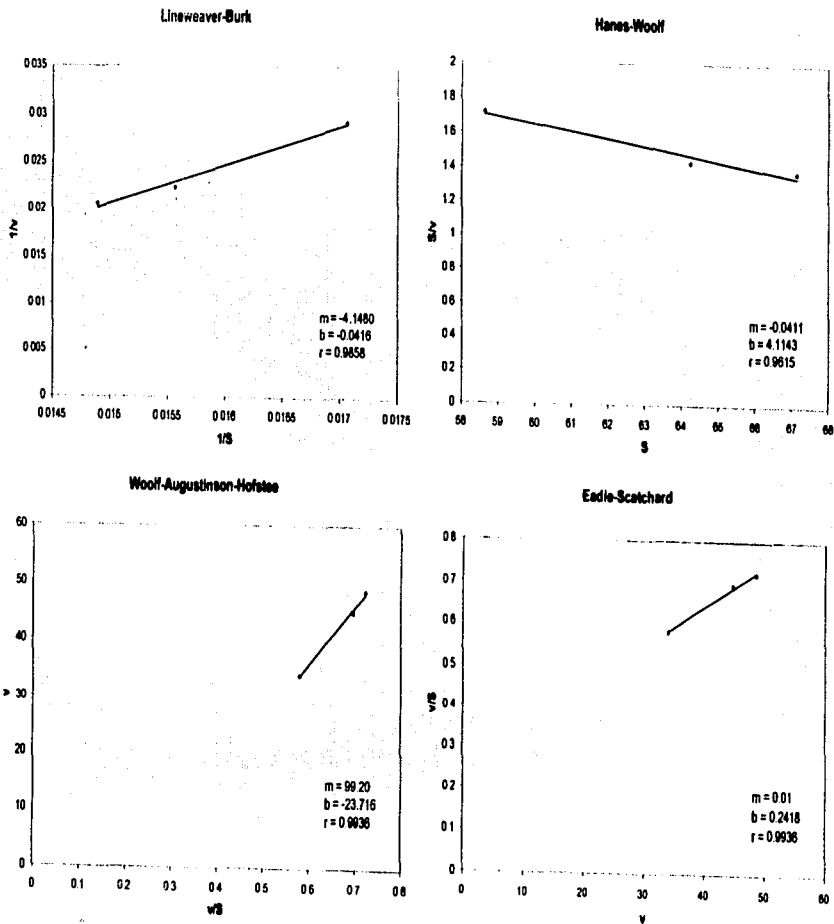


Figura 4.11 Resultados de los métodos para la obtención de constantes cinéticas K_m y V_{max}

TESTEADO
 FALTA DE CEMENTO

CICLO DE 12 HORAS



TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Figura 4.12 Resultados de los métodos para la obtención de constantes cinéticas K_m y V_{max}

4.1.2 Influencias exógenas

Se consideraron básicamente los efectos por concentraciones de Demanda Química de Oxígeno (DQO), oxígeno disuelto y amonio.

4.1.2.1 Efecto por fuente de carbono

Se intentó explicar el comportamiento sigmoidal durante la fase inicial aerobia, atribuyendo este a presencia de material orgánico no capturado durante la fase anaerobia previa. La explicación que se intentó dar se basó en la suposición de que si existe material orgánico al inicio de la fase aerobia, el cual prácticamente debería ser eliminado durante la fase anaerobia, puede propiciar que los mecanismos enzimáticos presentes durante esta última fase continúen activos al inicio de la fase aerobia y al mismo tiempo, el sistema enzimático debe ajustarse a las nuevas condiciones aerobias. Este periodo de transición podría reflejarse en el comportamiento sigmoidal antes mencionado.

Las figuras 4.13 a 4.15 muestran las remociones de DQO obtenidas en los primeros treinta minutos de fase aerobia, para los ciclos de 6, 8 y 12 h, respectivamente. Las gráficas se dividieron en tres partes para mostrar las remociones reportadas para las tres duraciones de fase anaerobia aplicadas a cada uno de los ciclos. La eliminación de DQO durante el periodo de tiempo mencionado (en mg/l) se indica en la parte superior de las barras. En las tablas 1 a 9 del apéndice se muestran las concentraciones de DQO determinadas cada media hora durante los ciclos utilizados.

Considerando la explicación que se intentó dar, el comportamiento sigmoidal debería observarse en presencia de materia orgánica en el agua residual al inicio de la fase aerobia. Sin embargo, la corrida de 6 horas con 63 % de fase anaerobia carece de materia orgánica al inicio de la fase aerobia (ver figura 4.13) y presenta

el comportamiento sigmoideal, lo cual permite afirmar que no existe influencia en la fase sigmoideal por efecto de carbono.

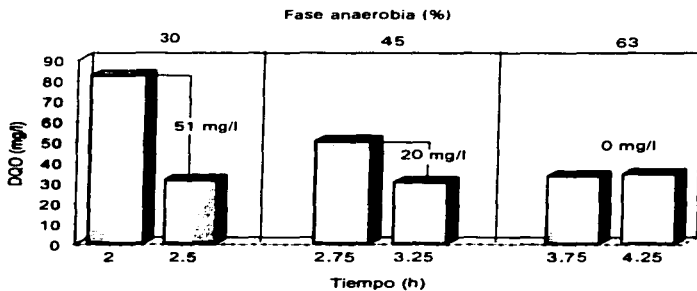


Figura 4.13 Valores de DQO al inicio de la fase aerobia y treinta minutos después para el ciclo de 6h

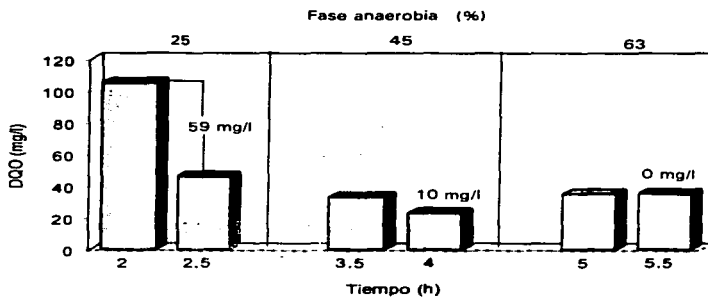


Figura 4.14 Valores de DQO al inicio de la fase aerobia y treinta minutos después para el ciclo de 8h

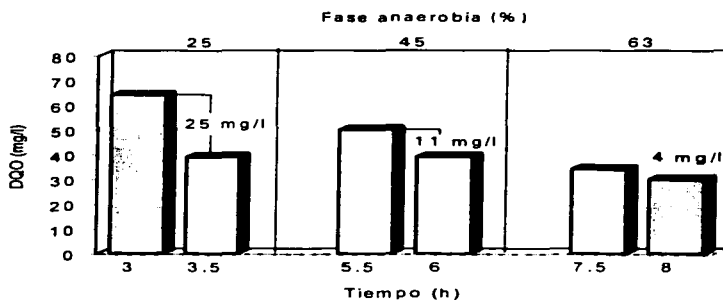


Figura 4.15 Valores de DCO al inicio de la fase aerobia y treinta minutos después para el ciclo de 12h

4.1.2.2 Efecto por fuente de nitrógeno

Las figuras 4.16 a 4.18 muestran las concentraciones de nitrógeno amoniacal obtenidas durante los primeros treinta minutos de la fase aerobia, para los ciclos de 6, 8 y 12 h, respectivamente.

En las tablas 1 a 9 del apéndice se puede observar que la concentración de nitrógeno amoniacal al inicio de la fase aerobia varía, en todos los casos, entre 8 y 12 mg/l. Las figuras 4.16 a 4.18 muestran que el $N-NH_4$ consumido durante los primeros treinta minutos en condiciones aerobias es muy similar (nunca es mayor de 20% del valor inicial), independientemente de que se presente o no el comportamiento sigmoideal. Con base en esta observación se considera que el nitrógeno amoniacal no tiene ningún efecto sobre la fase anteriormente mencionada.

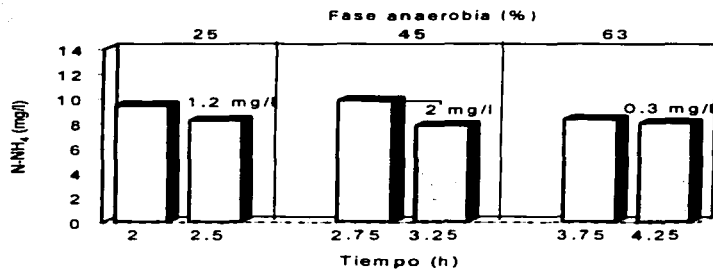


Figura 4.16 Concentración de nitrógeno amoniacal al inicio de la fase aerobia y treinta minutos después para el ciclo de 6h

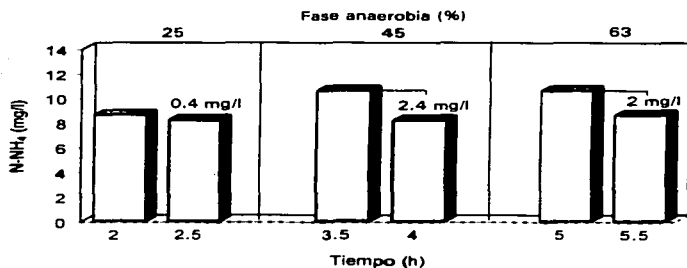


Figura 4.17 Concentración de nitrógeno amoniacal al inicio de la fase aerobia y treinta minutos después para el ciclo de 8h

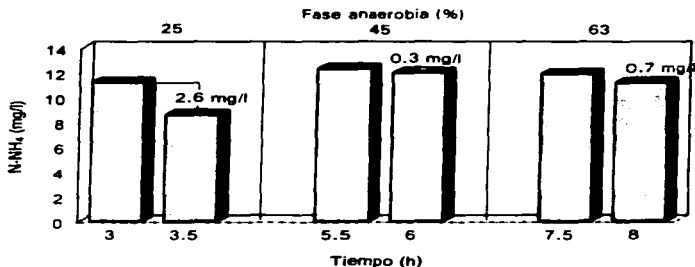


Figura 4.18 Concentración de nitrógeno amoniacal al inicio de la fase aerobia y treinta minutos después para el ciclo de 12h

4.1.2.3 Efecto por oxígeno disuelto

Las figuras 4.19 a 4.21 muestran las concentraciones de oxígeno obtenidas durante los primeros treinta minutos de la fase aerobia para los ciclos de 6, 8 y 12h.

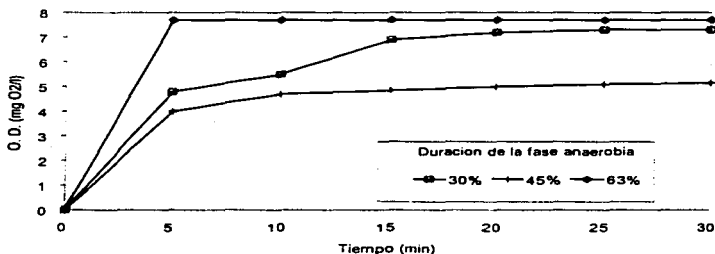


Figura 4.19 Concentración de oxígeno disuelto durante los primeros treinta minutos de fase aerobia para el ciclo de 6h.

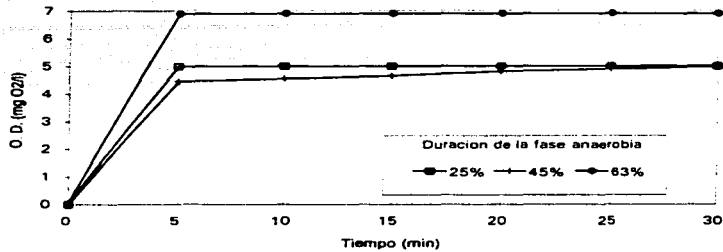


Figura 4.20 Concentración de oxígeno disuelto durante los primeros treinta minutos de fase aerobia para el ciclo de 8h.

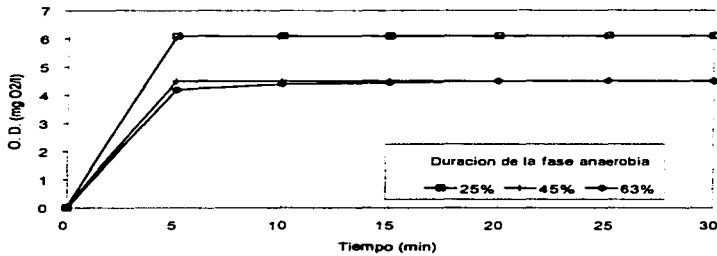


Figura 4.21 Concentración de oxígeno disuelto durante los primeros treinta minutos de fase aerobia para el ciclo de 12h.

Es necesario señalar que la información experimental se obtuvo en Alemania, por lo que existen concentraciones de oxígeno disuelto que se encuentran por arriba de 6.9 mg/l, valor máximo (a 20°C) que se puede lograr a la altura de la Cd. de México. En las tablas 1 a 9 del apéndice se muestran los resultados completos obtenidos durante la fase experimental.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Se consideró que el comportamiento sigmoidal observado durante el proceso de captura de fósforo, puede ser consecuencia de una transferencia de oxígeno disuelto poco eficiente, de tal forma, que durante los primeros minutos no se establecen rápidamente condiciones aerobias, lo cual implica que durante este periodo los sistemas enzimáticos no están completamente ajustados para utilizar al oxígeno como aceptor de electrones.

En las figuras 4.1 a 4.3 se observa que el comportamiento sigmoidal es mas evidente durante los primeros 90 minutos (aproximadamente), una vez iniciada la fase aerobia. En las figuras 4.19 a 4.21 se puede observar que el patrón general es el establecimiento de una concentración de oxígeno suficientemente alta a los 5 minutos de iniciada la fase aerobia (en todos los casos arriba de 3.5 mg/l), lo cual indica buena transferencia de oxígeno y descarta la posibilidad de que este elemento influya en el comportamiento sigmoidal.

Con base en el análisis del efecto de carbono, nitrógeno amoniacal y oxígeno se descartó que estos elementos influyan en la fase inicial, por lo tanto, se consideró al comportamiento sigmoidal como parte del mecanismo enzimático involucrado. Este tipo de comportamiento generalmente se presenta en enzimas alostéricas, las cuales son la variable más común del mecanismo enzimático clásico.

4.1.3 Definición del modelo alostérico

La definición de este modelo se realizó considerando los valores de concentración y de rapidez inicial reportados en la tabla 4.1.

Las determinaciones del número de sitios cooperativos y de la rapidez máxima del proceso se hicieron utilizando los métodos de Lineweaver y Burk y Hill.

Para la definición del número de sitios cooperativos, aplicando el método de Lineweaver y Burk, se realizaron linearizaciones elevando n , número de sitios

cooperativos, de 1 hasta 10. Los resultados con los que se obtuvieron los mejores coeficientes de correlación (de 0.85 a 0.99), así como valores positivos V_{max} , fueron para la linerización elevando n a la cuarta potencia, es decir, para cuatro sitios cooperativos. La figura 4.22 muestra los resultados obtenidos.

Los resultados aplicando el método de Hill se observan en la figura 4.23. En estas figuras se muestra la pendiente de las rectas, la cual corresponde al número de sitios cooperativos de la enzima o complejo enzimático. Se observa que el valor más alto para el coeficiente de correlación es para el ciclo de 12 horas, obteniéndose cuatro sitios cooperativos (3.94).

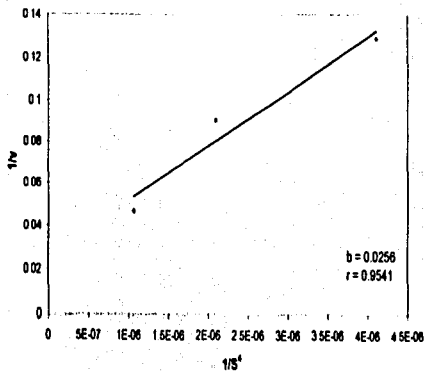
Con base en los resultados obtenidos con los métodos de Lineweaver y Burk y Hill se considera que la enzima o complejo enzimático que participa en el proceso de remoción de fósforo presenta cuatro sitios de unión. La presencia de más de un sitio de unión es la base para suponer la existencia de mecanismos alostéricos. Sin embargo, esta información no es definitiva ya que pueden existir múltiples, pero independientes sitios de unión al sustrato. Los mecanismos cooperativos se confirman a través de los valores de las constantes intrínsecas de asociación; esta información se obtiene, como se verá en los capítulos siguientes, a partir del modelo catalítico.

Los valores de V_{max} (obtenidos con el método de Lineweaver y Burk) se muestran en la tabla 4.3.

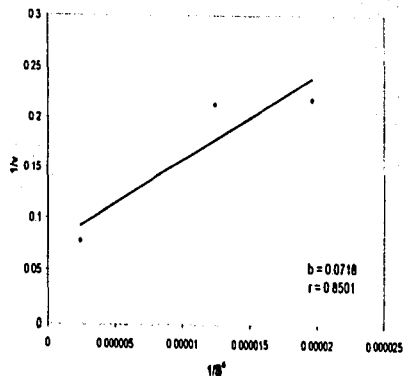
Tabla 4.3 Resultados para V_{max} aplicando el método de Lineweaver y Burk

Ciclo (h)	Valor de V_{max} (mg/l h)
6	39.03
8	13.93
12	125.66

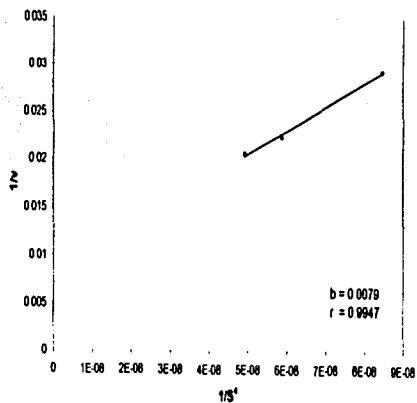
Ciclo de 6 horas



Ciclo de 8 horas



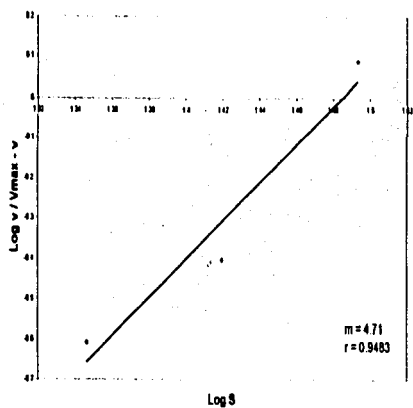
Ciclo de 12 horas



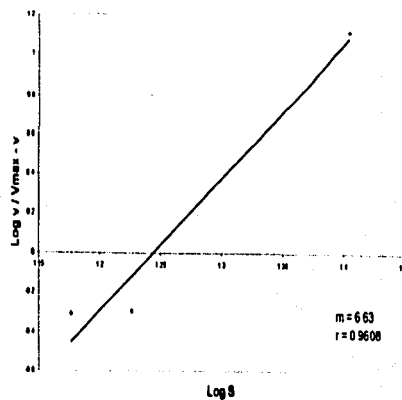
TESIS CON
FALTA DE ORDEN

Figura 4.22. Resultados obtenidos al aplicar el método de Lineweaver y Burk utilizando cuatro sitios cooperativos

Ciclo de 6 horas



Ciclo de 8 horas



Ciclo de 12 horas

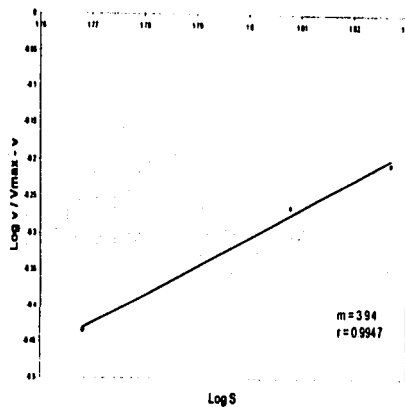


Figura 4.23. Resultados obtenidos al aplicar el método de Hill

TESIS
FALLA DE CEMENTO

Se observa que la rapidez máxima del proceso es diferente para los tres ciclos utilizados. Esto se puede deber a desplazamientos poblacionales, propiciados por la diferencia en la duración de los ciclos, lo cual implica diferencias cinéticas en las películas biológicas.

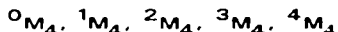
4.1.3.1 Determinación del modelo catalítico

a) Determinación de la concentración de las formas enzimáticas presentes

1. Obtención del número total de variantes. Para una molécula enzimática con 4 sitios de unión se presentan 16 variantes:

$$\sum_{i=0}^4 2^i = 16 \quad (4.1)$$

2. Determinación de las concentraciones de las formas enzimáticas presentes. Para una molécula con cuatro centros de unión equivalentes por molécula para el ligando existen cinco formas:

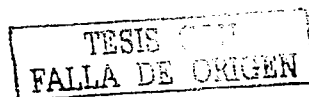


La figura 4.24 muestra, de manera esquemática, las formas presentes para una macromolécula enzimática con cuatro sitios de unión.

Las concentraciones de las diferentes formas son las siguientes:

$${}^0M_4 = {}^0M_4', \quad {}^1M_4 = 4{}^1M_4', \quad {}^2M_4 = 6{}^2M_4', \quad {}^3M_4 = 4{}^3M_4', \quad {}^4M_4 = {}^4M_4' \quad (4.2)$$

Las fracciones molares en equilibrio para cada una de las formas son iguales a:



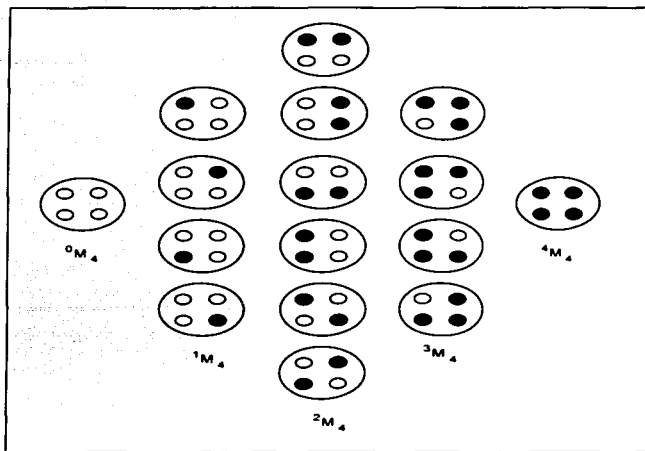


Figura 4.24 Representación de las formas presentes para una enzima con 4 sitios de unión por molécula. Los círculos abiertos simbolizan centros libres y los círculos llenos sitios ocupados por el sustrato.

$${}^0F_4 = \frac{{}^0M_4}{\Sigma M}, \quad {}^1F_4 = 4 \frac{{}^1M_4}{\Sigma M}, \quad {}^2F_4 = 6 \frac{{}^2M_4}{\Sigma M}, \quad {}^3F_4 = 4 \frac{{}^3M_4}{\Sigma M}, \quad {}^4F_4 = \frac{{}^4M_4}{\Sigma M} \quad (4.3)$$

donde:

$$\Sigma M = {}^0M_4 + 4{}^1M_4 + 6{}^2M_4 + 4{}^3M_4 + {}^4M_4 \quad (4.4)$$

Las reacciones de asociación a través de las cuales se produce la unión de S con cada sitio de unión de M son las siguientes:



$${}^1M_4' + S \rightleftharpoons {}^2M_4' \quad (4.6)$$

$${}^2M_4' + S \rightleftharpoons {}^3M_4' \quad (4.7)$$

$${}^3M_4' + S \rightleftharpoons {}^4M_4' \quad (4.8)$$

a las cuales corresponden las constantes intrínsecas de asociación:

$${}^1k_4 = \frac{{}^1M_4'}{S {}^0M_4}, \quad {}^2k_4 = \frac{{}^2M_4'}{S {}^1M_4}, \quad {}^3k_4 = \frac{{}^3M_4'}{S {}^2M_4}, \quad {}^4k_4 = \frac{{}^4M_4'}{S {}^3M_4} \quad (4.9)$$

Tomando en cuenta las expresiones 4.9, las expresiones 4.3 adoptan la forma:

$${}^0F_4 = \frac{1}{4 P_x}, \quad {}^1F_4 = 4 \frac{{}^1k_4 S}{4 P_x}, \quad {}^2F_4 = 6 \frac{{}^1k_4 {}^2k_4 S^2}{4 P_x} \quad (4.10)$$

$${}^3F_4 = 4 \frac{{}^1k_4 {}^2k_4 {}^3k_4 S^3}{4 P_x}, \quad {}^4F_4 = \frac{{}^1k_4 {}^2k_4 {}^3k_4 {}^4k_4 S^4}{4 P_x}$$

donde el polinomio de unión es igual a:

$$4P_x = 1 + 4 {}^1k_4 S + 6 {}^1k_4 {}^2k_4 S^2 + 4 {}^1k_4 {}^2k_4 {}^3k_4 S^3 + {}^1k_4 {}^2k_4 {}^3k_4 {}^4k_4 S^4$$

El numerador de las expresiones 4.10 refleja la multiplicidad para cada una de las formas $'M_4'$.

b) Determinación de las formas eficientes en la catálisis

Las variantes eficaces en la catálisis son MS , MS_2 , MS_3 y MS_4 y sus contribuciones a la catálisis están dadas por:

$$4^1 k_{\text{cat}} \cdot MS \quad (4.11)$$

$$12^2 k_{\text{cat}} \cdot MS_2 \quad (4.12)$$

$$12^3 k_{\text{cat}} \cdot MS_3 \quad (4.13)$$

$$4^4 k_{\text{cat}} \cdot MS_4 \quad (4.14)$$

c) Definición del modelo catalítico

Al dividir las contribuciones a la catálisis entre la suma de todas las formas presentes se obtiene la actividad molar:

$$\frac{v}{M_t} = \frac{4^1 k_{\text{cat}} \cdot 1 k_4 [S] + 12^2 k_{\text{cat}} \cdot 1 k_4 \cdot 2 k_4 [S]^2 + 12^3 k_{\text{cat}} \cdot 1 k_4 \cdot 2 k_4 \cdot 3 k_4 [S]^3 + 4^4 k_{\text{cat}} \cdot 1 k_4 \cdot 2 k_4 \cdot 3 k_4 \cdot 4 k_4 [S]^4}{1 + 4^1 k_4 [S] + 6^1 k_4 \cdot 2 k_4 [S]^2 + 4^1 k_4 \cdot 2 k_4 \cdot 3 k_4 [S]^3 + 1 k_4 \cdot 2 k_4 \cdot 3 k_4 \cdot 4 k_4 [S]^4} \quad (4.15)$$

Al multiplicar los dos miembros e introducir las siguientes sustituciones:

$$1 k_{\text{cat}} \cdot M_t = V_{\text{max}} \quad (4.16)$$

$$2 k_{\text{cat}} \cdot M_t = \sigma V_{\text{max}} \quad (4.17)$$

$$3 k_{\text{cat}} \cdot M_t = \sigma^2 V_{\text{max}} \quad (4.18)$$

$$4 k_{\text{cat}} \cdot M_t = \sigma^3 V_{\text{max}} \quad (4.19)$$

Se obtiene la ecuación de rapidez:

$$v = V_{\text{max}} \cdot \frac{4^1 k_4 [S] + 12 \sigma^1 k_4 \cdot 2 k_4 [S]^2 + 12 (\sigma^2)^1 k_4 \cdot 2 k_4 \cdot 3 k_4 [S]^3 + 4 (\sigma^3)^1 k_4 \cdot 2 k_4 \cdot 3 k_4 \cdot 4 k_4 [S]^4}{1 + 4^1 k_4 [S] + 6^1 k_4 \cdot 2 k_4 [S]^2 + 4^1 k_4 \cdot 2 k_4 \cdot 3 k_4 [S]^3 + 1 k_4 \cdot 2 k_4 \cdot 3 k_4 \cdot 4 k_4 [S]^4} \quad (4.20)$$

Dividiendo entre $4^1 k_4$:

$$v = V_{\max} \frac{[S] + 3\sigma^2 k_4 [S]^2 + 3(\sigma^2)^2 k_4^3 k_4 [S]^3 + (\sigma^3)^2 k_4^3 k_4^4 k_4 [S]^4}{\frac{0.25}{k_4} + [S] + 1.5^2 k_4 [S]^2 + 2 k_4^3 k_4 [S]^3 + 0.25^2 k_4^3 k_4^4 k_4 [S]^4} \quad (4.21)$$

Con el fin de obtener mayor claridad en la interpretación de las ecuaciones posteriores se hicieron las siguientes sustituciones en la notación de las constantes intrínsecas:

$${}^1K_4 = A, \quad {}^2K_4 = B, \quad {}^3K_4 = C, \quad {}^4K_4 = D$$

Tomando en cuenta esta última consideración es posible reescribir la ecuación (4.21) de la siguiente forma:

$$v = V_{\max} \frac{[S] + 3\sigma B[S]^2 + 3(\sigma^2)BC[S]^3 + (\sigma^3)BCD[S]^4}{\frac{0.25}{A} + [S] + 1.5B[S]^2 + BC[S]^3 + 0.25BCD[S]^4} \quad (4.22)$$

d) Obtención de los valores para las constantes intrínsecas y los factores de efectividad catalítica. Los resultados obtenidos, utilizando las representaciones directa, semiinversa, Lineweaver y Burk, Eadie y Hofstee, son los siguientes:

Representación directa. A partir de la ecuación 4.22 se obtuvieron los límites:

$$\begin{aligned} \lim_{S \rightarrow 0} v &= 0 & \lim_{S \rightarrow \infty} v &= 4\sigma^3 V_{\max} \end{aligned} \quad (4.23)$$

La pendiente de la tangente a la curva obtenida en la representación viene dada por la derivada:

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

$$\frac{dv}{dS} = V_{\max} \frac{aS^6 + bS^5 + cS^4 + dS^3 + eS^2 + fS + g}{\left[\frac{0.25}{A} + S + 1.5BS^2 + BCS^3 + 0.25BCDS^4 \right]^2} \quad (4.24)$$

donde:

$$\begin{aligned} aS^6 + bS^5 + cS^4 + dS^3 + eS^2 + fS + g = & \left[(-0.75\sigma^2 + \sigma^3) B^2 C^2 D \right] S^6 + \left[(-1.5\sigma + 3\sigma^3) B^2 CD \right] S^5 + \\ & + \left[(-0.75D - 3\sigma B + 4.5\sigma^2 B + 3\sigma^3 D) BC \right] S^4 + \left[\left(-2 + 6\sigma^2 + 4\sigma^3 D \frac{0.25}{A} \right) BC \right] S^3 + \left[\left(-1.5 + 3\sigma + 9\sigma^2 C \frac{0.25}{A} \right) B \right] S^2 + \\ & + \left[6\sigma B \frac{0.25}{A} \right] S + \frac{0.25}{A} \end{aligned}$$

la cual tiende a los límites:

$$\lim_{S \rightarrow 0} \frac{dv}{dS} = V_{\max} \frac{A}{0.25} \quad \lim_{S \rightarrow \infty} v = 0 \quad (4.25)$$

Representación semiinversa. A partir de la ecuación 4.22 se obtuvieron los siguientes límites:

$$\lim_{S \rightarrow 0} v = V_{\max} 4\sigma^3 \quad \lim_{S \rightarrow \infty} v = 0 \quad (4.26)$$

La primera derivada para esta representación es igual a:

$$\frac{dv}{d\left[\frac{1}{S}\right]} = \frac{dv}{dS^{-1}} = -\frac{dv}{dS} S^2 = -V_{\max} S^2 \frac{aS^6 + bS^5 + cS^4 + dS^3 + eS^2 + fS + g}{\left[\frac{0.25}{A} + S + 1.5BS^2 + BCS^3 + 0.25BCDS^4 \right]^2} \quad (4.27)$$

la cual tiende a los límites:

TESIS
FALLA DE ORIGEN

$$\lim_{\frac{1}{S} \rightarrow 0} \frac{dv}{d\left[\frac{1}{S}\right]} = -V_{\max} \frac{16(\sigma^3 - 0.75\sigma^2)}{D} \quad \lim_{\frac{1}{S} \rightarrow \infty} \frac{dv}{d\left[\frac{1}{S}\right]} = 0 \quad (4.28)$$

Representación de Lineweaver y Burk. La ecuación 4.22 se puede reescribir como:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\max}} \frac{0.25}{A} + \frac{S + 1.5BS^2 + BCS^3 + 0.25BCDS^4}{S + 3\sigma BS^2 + 3\sigma^2 BCS^3 + \sigma^3 BCDS^4} \quad (4.29)$$

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\max}} \frac{F\left(\frac{1}{S}\right)^4 + \left(\frac{1}{S}\right)^3 + 1.5B\left(\frac{1}{S}\right)^2 + BC\left(\frac{1}{S}\right) + 0.25BCD}{\frac{1}{S^3} + 3\sigma B\frac{1}{S^2} + 3\sigma^2 BC\frac{1}{S} + \sigma^3 BCD} \quad (4.30)$$

considerando que $1/S = X$, se tiene:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\max}} \frac{FX^4 + X^3 + 1.5BX^2 + BCX + 0.25BCD}{X^3 + 3\sigma BX^2 + 3\sigma^2 BCX + \sigma^3 BCD} \quad (4.31)$$

la cual tiende a los límites:

$$\lim_{\frac{1}{S} \rightarrow 0} \frac{1}{v} = \frac{0.25}{V_{\max}\sigma^3} \quad \lim_{\frac{1}{S} \rightarrow \infty} \frac{1}{v} = \infty \quad (4.32)$$

la derivada para la ecuación 4.31, en términos de S, es igual a:

$$\frac{d \frac{1}{v}}{d \frac{1}{S}} = \frac{a'S^6 + b'S^5 + c'S^4 + d'S^3 + e'S^2 + f'S + g'}{(1 + 3\sigma BS + 3\sigma^2 BCS^2 + \sigma^3 BCDS^3)^2} \quad (4.33)$$

donde:

$$a'S^6 + b'S^5 + c'S^4 + d'S^3 + e'S^2 + f'S + g' = [(-0.75\sigma^2 + \sigma^3)B^2C^2D]S^6 + [(+1.5\sigma + 3\sigma^3)B^2CD]S^5 + \\ + [(-0.75D - 3\sigma B + 4.5\sigma^2B - 3\sigma^3D)BC]S^4 + \left[\left(-2 + 6\sigma^2 + 4\sigma^3D \frac{0.25}{A} \right) BC \right] S^3 + \left[\left(-1.5 + 3\sigma + 9\sigma^2C \frac{0.25}{A} \right) B \right] S^2 + \\ + 6\sigma B \frac{0.25}{A} S + \frac{0.25}{A}$$

la cual tiende a los límites:

$$\lim_{d \frac{1}{S}} \frac{d \frac{1}{v}}{d \frac{1}{S}} = \frac{\sigma^3 - 0.75\sigma^2}{V_{\max} D (\sigma^3)^2} \quad \lim_{d \frac{1}{S}} \frac{d \frac{1}{v}}{d \frac{1}{S}} = \frac{0.25}{AV_{\max}} \quad (4.34)$$

$$\frac{1}{S} \rightarrow 0 \quad \frac{1}{S} \rightarrow \infty$$

Representación de Eadie. La ecuación de rapidez 4.29 se puede transformar en:

$$\frac{S}{v} = \frac{1}{V_{\max}} \frac{0.25}{A} S + S^2 + 1.5BS^3 + BCS^4 + 0.25BCDS^5}{S + 3\sigma BS^2 + 3\sigma^2 BCS^3 + \sigma^3 BCDS^4} \quad (4.35)$$

Dividiendo entre S:

$$\frac{S}{v} = \frac{1}{V_{\max}} \frac{0.25}{A} + S + 1.5BS^2 + BCS^3 + 0.25BCDS^4}{1 + 3\sigma BS + 3\sigma^2 BCS^2 + \sigma^3 BCDS^3} \quad (4.36)$$

a la cual corresponden los siguientes límites:

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

$$\lim_{v \rightarrow 0} \frac{S}{v} = \frac{0.25}{AV_{\max}} \qquad \lim_{S \rightarrow \infty} \frac{S}{v} = \infty \qquad (4.37)$$

La pendiente de la tangente obtenida en esta representación es igual a:

$$\frac{dS}{dv} = \frac{1}{V_{\max}} \frac{a''S^6 + b''S^5 + c''S^4 + d''S^3 + e''S^2 + f''S + g}{(1 + 3\sigma BS + 3\sigma^2 BCS^2 + \sigma^3 BCDS^3)^2} \qquad (4.38)$$

donde:

$$\begin{aligned} a''S^6 + b''S^5 + c''S^4 + d''S^3 + e''S^2 + f''S + g'' = & [0.25\sigma^3 B^2 C^2 D^2] S^6 + [1.5\sigma^2 B^2 C^2 D] S^5 + \\ & + [(+2.25\sigma D + 3\sigma^2 C - 1.5\sigma^3 D) B^2 C] S^4 + [(+D + 6\sigma B - 2\sigma^3 D) BC] S^3 + \left[(+3C + 4.5\sigma B - 3\sigma^2 C + \frac{0.75}{A} \sigma^3 CD) B \right] S^2 + \\ & + \left[\left(3 + \frac{1.5}{A} \sigma^2 C \right) B \right] S + \frac{0.75}{A} \sigma B + 1 \end{aligned}$$

la cual tiende a los límites:

$$\lim_{v \rightarrow 0} \frac{dS}{dS} = \frac{0.75}{A} \sigma B + 1 \qquad \lim_{S \rightarrow \infty} \frac{dS}{dS} = \frac{0.25}{V_{\max} \sigma^3} \qquad (4.39)$$

Representación de Hofstee. En esta representación se utilizaron las siguientes ecuaciones:

$$v = V_{\max} \frac{[S] + 3\sigma B[S]^2 + 3\sigma^2 BC[S]^3 + \sigma^3 BCD[S]^4}{\frac{0.25}{A} + [S] + 1.5B[S]^2 + BC[S]^3 + 0.25BCD[S]^4} \qquad (4.40)$$

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

$$\frac{v}{S} = V_{\max} \frac{1 + 3\sigma BS + 3\sigma^2 BCS^2 + \sigma^3 BCDS^3}{\frac{0.25}{A} + S + 1.5BS^2 + BCS^3 + 0.25BCDS^4} \quad (4.41)$$

Los valores para los límites de las ecuaciones 4.40 y 4.41 son:

$$\lim_{S \rightarrow 0} v = 0 \qquad \lim_{S \rightarrow \infty} v = 4\sigma^3 V_{\max} \quad (4.42)$$

$$\lim_{S \rightarrow 0} \frac{v}{S} = V_{\max} \frac{A}{0.25} \qquad \lim_{S \rightarrow \infty} \frac{v}{S} = 0 \quad (4.43)$$

Utilizando las ecuaciones 4.40 y 4.41 se obtiene para la derivada:

$$\frac{d \frac{v}{S}}{dS} = \frac{\frac{d \frac{v}{S}}{dS}}{\frac{dv}{dS}} = \frac{a''''S^6 + b''''S^5 + c''''S^4 + d''''S^3 + e''''S^2 + f''''S + g''''}{aS^6 + bS^5 + cS^4 + dS^3 + eS^2 + fS + g} \quad (4.44)$$

donde:

$$a''''S^6 + b''''S^5 + c''''S^4 + d''''S^3 + e''''S^2 + f''''S + g'''' = [-0.25\sigma^3 B^2 C^2 D^2] B^6 + [-1.5\sigma^2 B^2 C^2 D] B^5 + \\ + [(-2.25\sigma D - 3\sigma^2 C + 1.5\sigma^3 D) B^2 C] B^4 + [(+D + 2\sigma^3 D) BC] B^3 + \left[\left(+3C - 4.5\sigma B + 3\sigma^2 C + \frac{0.75}{A} \sigma^3 CD \right) B \right] S^2 + \\ + \left[\left(3 - 6\sigma BC + \frac{1.5}{A} \sigma^3 C \right) B \right] S + \frac{0.75}{A} \sigma B + 1$$

la cual tiende a los límites:

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

$$\lim_{\frac{d}{dv}} \frac{v}{S} = \frac{0.75\sigma B + A}{0.25}$$

$$\text{Si } v \rightarrow 0, S \rightarrow 0^*$$

* Ver las expresiones de 4.42

$$\lim_{\frac{d}{dv}} \frac{v}{S} = \frac{D}{3\left(\frac{\sigma^2}{\sigma^3}\right) - 4}$$

$$\text{Si } v \rightarrow 4\sigma^3 V_{\max}, S \rightarrow \infty^*$$

(4.45)

La tabla 4.4 muestra, en resumen, las ecuaciones que se obtuvieron para cada representación, las cuales permiten obtener los valores de las constantes intrínsecas y de los factores de interacción involucrados en la ecuación 4.22. En la misma tabla se observan los valores obtenidos para la interpretación de cada ecuación. La constante de interacción, C, no se incluye en ninguna de las ecuaciones de esta tabla. El valor de esta constante se obtuvo mediante un proceso de iteración, utilizando la ecuación 4.22 y los valores experimentales de v.

Los valores para los parámetros cinéticos del modelo, obtenidos con base en la información de la tabla 4.4, se muestran en la tabla 4.5. Se observa que los valores para las constantes intrínsecas y los factores de efectividad catalítica para los 3 ciclos (en especial para los ciclos de 6 y 12 horas) son similares, a excepción de C para el ciclo de 8 h. Esta similitud confirma que el mecanismo cinético a través del cual se realiza el proceso de captura de fósforo es el mismo para los tres ciclos utilizados.

Si los centros son independientes las constantes intrínsecas (A, B, C y D) son iguales; si alguna es diferente hay cooperatividad y los centros están ligados. Con base en esta información y en los valores reportados en la tabla 4.5, la enzima o complejo enzimático que participa en el proceso de captura de fósforo se comporta como una enzima alostérica. El número de sitios de unión (4) se obtuvo anteriormente aplicando los métodos de Lineweaver y Burk y Hill.

En la tabla 4.5 se observa que los valores obtenidos para σ son menores que 1, lo cual indica cooperatividad negativa en la catálisis. Esto significa que la enzima o

TIENE
FALLA DE CALIBRACION

Tabla 4.4 Ecuaciones e interpretaciones obtenidas para los ciclos de 6, 8 y 12h

Representación	Interpretación	Ecuación	Ciclo de 6h	Ciclo de 8h	Ciclo de 12h
Directa	Pendiente de la tangente en el origen	$V_{max} \frac{A}{0.25}$	0.3482	0.3043	0.6000
Semiinversa	Ordenada en el origen	$4\sigma^3 V_{max}$	53.45	25.56	165.66
	Pendiente en el origen	$-V_{max} \frac{16\sigma^3 - .75\sigma^2}{D}$	-1001.2	-321.07	-7669.7
Lineweaver y Burk	Pendiente de la tangente en el origen	$\frac{\sigma^3 - 0.75\sigma^2}{V_{max} D (\sigma^3)^2}$	6.3359	5.4154	4.3163
	Ordenada en el origen	$\frac{0.25}{V_{max} \sigma^3}$	-0.1560	-0.1359	-0.0448
Eadie	Ordenada en el origen	$\frac{0.25}{AV_{max}}$	6.4756	5.7654	4.2404
	Pendiente en el origen	$\frac{0.75}{A} \sigma B + 1$ $\frac{V_{max}}{V_{max}}$	-0.1622	-0.1650	-0.0439
Hofstee	Ordenada en el origen	$V_{max} \frac{A}{0.25}$	0.1499	0.1697	0.2336
	Abscisa en el origen	$V_{max} 4\sigma^3$	-5.9882	-6.4692	-22.311
	Pendiente de la tangente en el origen	$\frac{0.75\sigma + A}{0.25}$	0.0250	0.0262	0.0104
	Pendiente de la tangente en corte a las abscisas	$\frac{-D}{3 \left(\frac{\sigma^2}{\sigma^3} \right) - 4}$	0.0250	0.0262	0.0104

Tabla 4.5 Valores obtenidos para las constantes involucradas en el modelo de rapidez

Constante	Ciclo de 6h	Ciclo de 8h	Ciclo de 12h
V_{max} (mg/l h)	53.70	25.53	172.53
A (mg/l)	0.0022	0.0030	0.0011
B (mg/l)	0.0076	0.0060	0.0029
C (mg/l)	0.0247	0.7920	0.0244
D (mg/l)	0.0072	0.0088	0.0035
σ	0.6995	0.7712	0.6907
σ'	0.4893	0.5947	0.4770
σ''	0.3423	0.4587	0.3295

sistema enzimático involucrado en el proceso de remoción biológica de fósforo responde casi normalmente a concentraciones bajas de $P-PO_4^{3-}$, pero exhibe una marcada inhibición a concentraciones altas de sustrato. La disminución de la rapidez de consumo de sustrato bajo las condiciones mencionadas permite, fisiológicamente, un control fino del metabolismo celular.

4.1.3.2 Validación del modelo

La validación del modelo se realizó comparando resultados experimentales (no utilizados para la deducción del modelo) y teóricos (calculados usando el modelo) de concentración de $P-PO_4^{3-}$ en función del tiempo.

La obtención de los valores teóricos se realizó integrando la ecuación 4.22 en función del tiempo. La forma integral de la ecuación mencionada es la siguiente:

$$\int_t^{t_{max}} dt = \frac{1}{V_{max}} \int_{S_0}^S \left[\frac{0.25 + S + 1.5BS^2 + BCS^3 + 0.25BCDS^4}{S + 3\sigma BS^2 + 3\sigma^2 BCS^3 + \sigma^3 BCDS^4} \right] dS \quad (4.46)$$

Integrando el lado izquierdo de la ecuación 4.46 se tiene:

$$t_{\max} - t = \frac{1}{V_{\max}} \int_S^{S_0} \left[\frac{0.25 + S + 1.5BS^2 + BCS^3 + 0.25BCDS^4}{S + 3\sigma BS^2 + 3\sigma^2 BCS^3 + \sigma^3 BCDS^4} \right] dS \quad (4.47)$$

de donde el tiempo t que define la evolución del perfil de remoción de concentraciones de P-PO₄ resulta:

$$t = t_{\max} - \left[\frac{1}{V_{\max}} \int_S^{S_0} \left[\frac{0.25 + S + 1.5BS^2 + BCS^3 + 0.25BCDS^4}{S + 3\sigma BS^2 + 3\sigma^2 BCS^3 + \sigma^3 BCDS^4} \right] dS \right] \quad (4.48)$$

En esta última ecuación los valores de V_{\max} , de las constantes y de los factores de interacción, son valores ya determinados (tabla 4.5).

El intervalo de integración para la concentración de sustrato fue desde S hasta S_0 , donde S_0 corresponde a la concentración inicial reportada para cada una de las corridas y S es la concentración final mínima de P-PO₄, la cual es teóricamente factible de alcanzar utilizando procesos biológicos. El valor propuesto para esta última concentración fue de cero. Este valor se seleccionó con el fin de poder graficar la tendencia de la eliminación del sustrato hasta dicha concentración.

El valor del tiempo máximo (t_{\max}) se obtuvo a través del modelo, resolviendo la ecuación 4.47; estos resultados corresponden a los valores de $t_{\max}-t$. El valor obtenido para la concentración máxima experimental de P-PO₄ reportada (S_0 , concentración inicial) es el valor de t_{\max} , ya que $t = 0$. La diferencia entre t_{\max} y los valores $t_{\max}-t$ corresponden a los valores de t (ecuación 4.48).

El paquete que se utilizó para resolver las ecuaciones integrales fue MathCAD 2.0. Este paquete no pudo resolver la integral si el intervalo inferior con el que se

alimenta inicia en cero, por lo que se seleccionó como concentración mínima 1 mg/l. El resultado obtenido para concentraciones de 1 y 2 mg/l fue cero, por lo que los resultados consideran una concentración mínima alcanzable al final del proceso de 2 mg/l. Estos resultados se pueden deber a que el paquete no tiene suficiente capacidad para resolver la ecuación a valores bajos de concentración, por lo que se recomienda la verificación de resultados mediante el uso de otro paquete de integración que tenga mayor capacidad de resolución que MathCAD 2.0

Las curvas teóricas de concentración de P-PO₄ en función del tiempo que se obtuvieron se compararon con la información experimental disponible. Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 4.25 a 4.27. En estas gráficas la línea continua muestra las curvas obtenidas con el modelo y el símbolo ■ muestra los valores experimentales.

La figura 4.25 muestra las gráficas teóricas y la información experimental de tres corridas con una duración de ciclo de 6 horas. En las tres gráficas de esta figura se observa que los datos obtenidos con el modelo son muy similares a los resultados experimentales reportados. Las diferencias mínima y máxima entre las concentraciones finales de P-PO₄ experimentales y teóricas, son 0.3 y 2.8 mg/l, para las figuras (a) y (c), respectivamente. Los resultados obtenidos con el modelo, para las tres gráficas muestran que para alcanzar la concentración mínima teórica de P-PO₄ (inicio de la parte asintótica de la curva) se requiere un tiempo de aproximadamente 7 horas. Se observa también que la parte intermedia de la curva, en la cual existe una cinética de reacción de orden variable, es en la que se presenta un mejor ajuste de los datos.

La figura 4.26 muestra las gráficas teóricas y la información experimental de tres corridas con una duración de ciclo de 8 horas. En las tres gráficas de esta figura se observa que aunque existe mayor dispersión en la información experimental que en la generada para el ciclo de 6 horas, el modelo se ajusta de manera

razonable. En este caso, solo se obtuvieron las diferencias entre las concentraciones finales de $P-PO_4$ experimentales y teóricas, para las figuras (a) y (b), ya que en la figura (c) el valor final de concentración es muy alto, por lo que se puede considerar como error experimental. Las diferencias entre las figuras (a) y (b) son 1.4 y 2.9 mg/l, respectivamente. Los tiempos de aireación teóricos para alcanzar las concentración mínima teórica para las figuras (a), (b) y (c) son 7.5, 7.1 h y 6.3 h, respectivamente.

La figura 4.27 muestra la gráfica teórica y la información experimental de una corrida con una duración de ciclo de 12 horas. Se observa, que el ajuste es menos preciso que para las corridas de 6 y 8 horas, sin embargo, esta información no se pudo corroborar ya que no se contó con más información experimental. El tiempo de aireación fue de 6.5 h alcanzándose una concentración experimental de 1.3 mg/l. La información obtenida con el modelo llega hasta 5 h, ya que en este tiempo se alcanza la concentración mínima teórica, en este punto se observa que la diferencia entre las concentraciones teórica y experimental es de 0.25 mg/l. En la que se presenta un mejor ajuste de los datos, corresponde a la parte final, en la cual existe una cinética de reacción de orden cero.

Se aplicó la prueba "t" de student para establecer si existen diferencias significativas entre valores teóricos y experimentales de las corridas graficadas en las figuras 4.25 a 4.27. Para las corridas de 6 y 8 horas, los valores calculados de "t" (ver apéndice), se encontraron dentro del intervalo establecido en tablas para validar la hipótesis nula, es decir, no existen diferencias significativas entre valores teóricos y experimentales. Para el ciclo de 12 horas el valor calculado de "t" (ver apéndice) está fuera del intervalo establecido en tablas para la hipótesis nula, por lo que se valida la hipótesis alterna, determinándose diferencia significativa entre valores teóricos y experimentales. Es necesario señalar que como se comentó anteriormente, para este último ciclo solamente se contó con una corrida por lo que se recomienda corroborar estos resultados con nueva información experimental.

Con base en estos resultados es posible afirmar que los resultados obtenidos con el modelo definen el comportamiento de captura de fósforo durante la fase aerobia del proceso de remoción biológica de este elemento.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

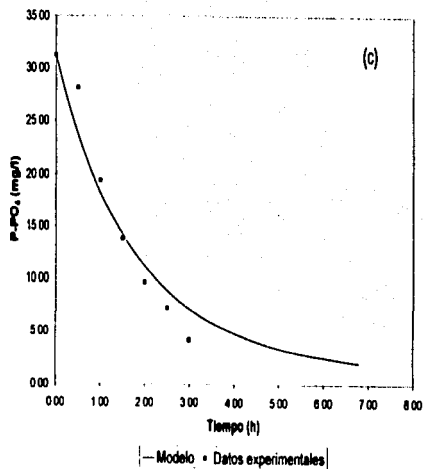
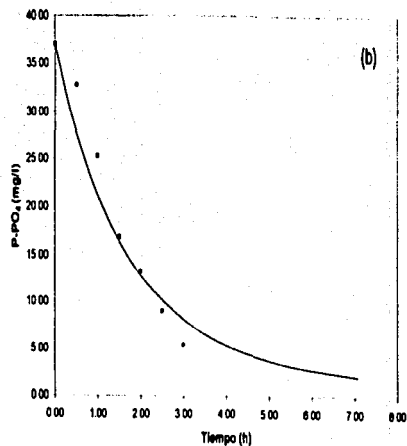
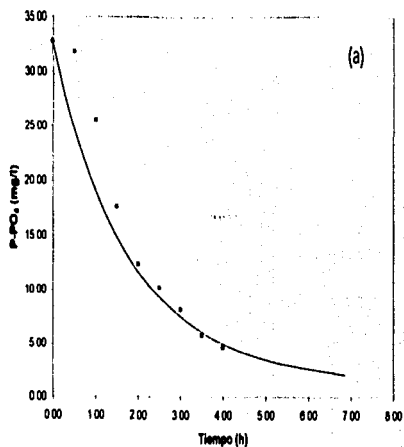


Figura 4.25. Comparación de valores obtenidos con el modelo cinético y valores experimentales para el ciclo de 6 horas

TESIS CON
 FALLA DE JUICIO

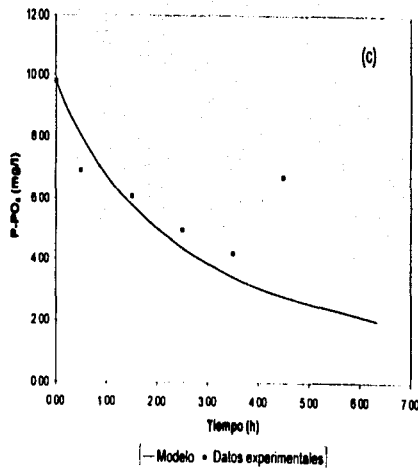
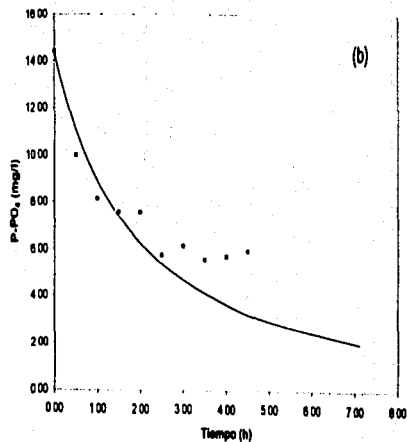
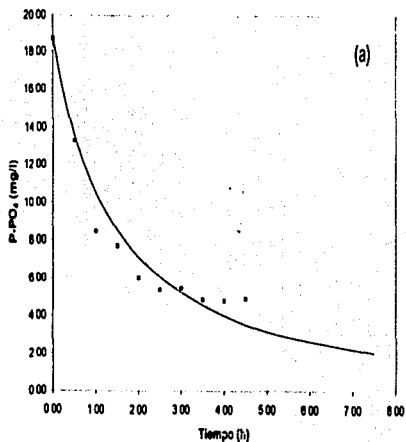


Figura 4.26. Comparación de valores obtenidos con el modelo cinético y valores experimentales para el ciclo de 8 horas

TESIS CON
 FALTA DE ORIGN

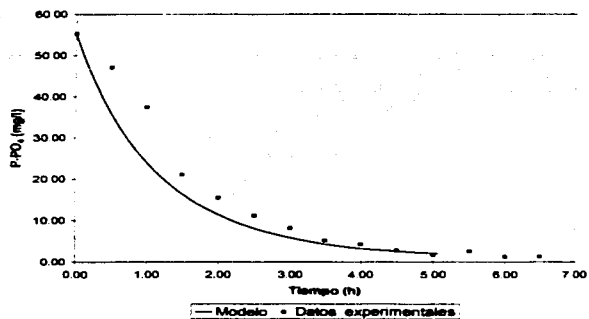


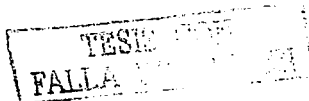
Figura 4.27. Comparación de valores obtenidos con el modelo cinético y valores experimentales para el ciclo de 12 horas

Finalmente, es necesario señalar que las condiciones fisicoquímicas (pH y temperatura, principalmente) son determinantes en el fenómeno cooperativo. Hiller y Carmeli (1990), Conslor y col. (1992) y Witherell y col. (1990) han observado mayor cooperatividad catalítica a temperaturas elevadas. En lo que se refiere a pH, estos últimos autores observaron un incremento en la cooperatividad a bajos valores de pH, mientras que Pishko y Robertus (1993) reportan lo contrario. La diferencia en esta información se puede deber a que este efecto depende de la naturaleza de las enzimas. La temperatura bajo la cual se obtuvo la información experimental que se utilizó para generar el modelo se indica en las tablas 1-9 del apéndice.

5. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones del trabajo son las siguientes:

- 1) La fase aerobia del proceso para remoción biológica de fósforo en aguas residuales no se ajusta al modelo clásico de Michaelis y Menten, lo cual se demostró al obtenerse valores negativos para las constantes K_m y V_{max} .
- 2) La enzima o complejo enzimático que participa en el proceso de captura de fósforo se comporta como una enzima con cuatro sitios de unión, de acuerdo con los resultados obtenidos al aplicar los métodos de Lineweaver y Burk y Hill.
- 3) Se propuso un modelo enzimático alostérico el cual relaciona la concentración de $P-PO_4^{3-}$ con la rapidez de consumo de este sustrato. Las constantes involucradas en el modelo son, constantes intrínsecas de asociación entre los sitios de unión ($^1K_4, ^2K_4, ^3K_4, ^4K_4$), factores de interacción (σ) y rapidez máxima del proceso (V_{max}).



- 4) Los valores de V_{max} obtenidos con el método de Lineweaver y Burk son diferentes para los 3 ciclos utilizados. Esto se puede desplazar poblacionales, lo cual implica diferencias cinéticas en las películas biológicas.
- 5) Los valores para 1K_4 , 2K_4 , 3K_4 , 4K_4 son diferentes entre sí, lo cual indica existencia de cooperatividad. Con base en estos resultados, el proceso de captura de fósforo puede describirse mediante un mecanismo enzimático alostérico.
- 6) Los resultados obtenidos para los factores de efectividad catalítica (σ) son menores de 1, lo cual demuestra que la enzima o complejo enzimático presenta un comportamiento alostérico negativo, es decir, esta enzima o complejo enzimático responde casi normalmente a concentraciones bajas de sustrato, pero exhibe una marcada inhibición a concentraciones altas. Este tipo de mecanismos se encuentran estrechamente relacionados con procesos de regulación metabólica celular.
- 7) La integración del modelo enzimático alostérico propuesto permite predecir, conociendo los valores de las constantes y el valor de concentración inicial de $P-PO_4^{3-}$, la tendencia de la eliminación de dicho sustrato durante la fase aerobia del proceso biológico para remoción de fósforo.
- 8) El modelo permite calcular los tiempos de aireación requeridos para reducir la concentración de $P-PO_4^{3-}$ únicamente hasta 2 mg/l, abajo de este valor el modelo no proporciona resultados confiables. Esta limitante se puede deber a que el paquete de cómputo no tiene suficiente capacidad para resolver la ecuación a valores bajos de concentración.
- 9) La validación del modelo se realizó comparando gráficas teóricas y experimentales, esta última información fue generada bajo condiciones

similares a la utilizada para la deducción de las constantes del modelo y solamente se usó para la validación del mismo. Con base en estos resultados se determinó estadísticamente que en 6 de 7 corridas no existen diferencias significativas, por lo que se considera que el modelo catalítico propuesto es capaz de describir el comportamiento observado durante el proceso de captura de fósforo.

RECOMENDACIONES

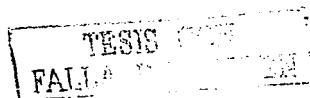
Las actividades que se sugiere realizar con el objetivo de afinar el modelo son las siguientes:

- 1) Obtención de nueva información experimental de consumo de $P-PO_4^{3-}$ en función del tiempo, en la cual se mida la concentración para un consumo máximo de 10 % de sustrato. Esta recomendación permitirá omitir el uso de las funciones polinomiales.
- 2) Utilizar un paquete de integración diferente a MathCad 2.0 con el fin de obtener valores de tiempo para concentraciones de $P-PO_4^{3-}$ inferiores a 2 mg/l.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

BIBLIOGRAFÍA

- Cadenas, E. (1978) *Enzimas alostéricas: Cooperatividad en la unión y en la catálisis*. Ed. Lumen. España.
- Conn E., Stumpf P. (1976) *Bioquímica fundamental*. Limusa (tercera edición). México.
- Consler, G.T, Jennewein, J.M, Zuan, C.G., Lee, C.J. (1992) Energetics of allosteric regulation in muscle pyruvate kinase, *Biochemistry* 31 (34): 7870 -7878.
- Cornish-Bowden, A., Koshland, D. E. (1970) A general method for the quantitative determination of saturation curves for multisubunit proteins, *Biochemistry* 9 (17): 3325-3336.
- Cornish-Bowden, A. (1976) *Principles of enzyme kinetics*. Ed. Butterworths. Inglaterra.
- Dixon M. (1979) *Enzymes*, Academic Press. E.U.A.
- Doria - Serrano, M, González - Martínez, S., Hernández - Esparza, M. (1992) Biochemical models for phosphate accumulating microorganisms. *Wat. Sci. Technol.* 26 (9/11): 2245-2248.
- González-Martínez S. (1989) Phosphate removal in a biofilm reactor. Informe del proyecto 9302 elaborado para la Comisión de Comunidades Europeas. *Dirección General de Ciencia Tecnología y Desarrollo*. Bélgica.
- González - Martínez S. (1990) Eliminación biológica de fosfatos : procesos



industriales. *Memorias del séptimo Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Ingeniería Sanitaria y Ambiental*. Oaxaca, México. 94-99.

González - Martínez, S., Wilderer, P. A. (1991) Phosphate removal in a biofilm reactor. *Wat. Sci. Technol.* 23 (7/9): 1405-1415.

Harremoës, P. (1978) Biofilm kinetics En: *Water Pollution Microbiology*, vol 2 Mitchell, R. (ed) John Wiley & Sons, E.U.A.

Hiller, R., Carmeli, C. (1990) Kinetic analysis of cooperative interactions induced by Mn^{2+} binding to the chloroplast H^+ -ATPase. *Biochemistry* 29: 6186-6192.

Koshland, D. E., Conway, A., Kirtley, M. (1968) Conformational changes and mechanism of action of rabbit muscle glyceraldehyde - 3 - phosphate dehydrogenase. En: *Regulation of enzyme activity and allosteric interactions*. Kuamme E. y Phil A. (ed). Academic Press, E.U.A. 131-143.

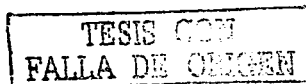
Koshland, D. E. (1976) The molecular basis for enzyme regulation. En: *Enzymes*, Boyer P. (ed). Academic Press, E.U.A. 341-395.

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

Luna, V., Aladro, M. Durán, C. (1990) Microorganismos indicadores del tratamiento biológico de aguas residuales: Efecto de la temperatura sobre la densidad y abundancia de protozoarios ciliados. *Publicación del Programa de Ingeniería Química Ambiental, Facultad de Química UNAM*.

Martin, W. D. (1986) Estructura y función de una proteína: la hemoglobina. En: *Bioquímica de Harper*. (Ed) El Manual Moderno, México. 42-52.

Nava-Ramírez C., González - Martínez M. S. (1995) Cinética de la remoción de



fósforo en reactores discontinuos con biopelícula. *Resúmenes del VI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería A. C.* Ixtapa, México, 97.

Nava - Ramírez.C., González-Martínez M. S. (2000) Phosphorus uptake kinetics in a biofilm sequencing batch reactor. *Bioprocess Engineering* 23: 143-147.

Pishko, J.E., Robertus, D.J. (1993) Site - directed alteration of three active site residues of a pyruvoyl-dependent histidine decarboxylase. *Biochemistry* 32: 4943-4948.

Rodwell, V. (1986) Propiedades cinéticas de las enzimas. En: *Bioquímica de Harper.*(Ed) El Manual Moderno, México. 73-92.

Rodwell, V. (1986) Regulación de la actividad enzimática. En: *Bioquímica de Harper.* (Ed) El Manual Moderno, México. 93-103

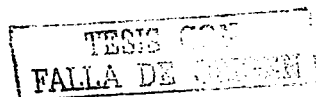
Ruiz-Treviño, F., González-Martínez, S., Doria-Serrano, M., Hernández-Esparza, M. (1992) Phosphorus release kinetics in anaerobic biofilm reactors. *Wat. Sci. Technol.* 26 (3): 567-576.

Segel, I. (1975) *Enzyme kinetics.* John Wiley & Sons, E.U.A

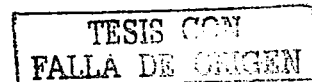
Segel, I. (1982) *Cálculos de bioquímica.* Acribia. Zaragoza, España.

Siebritz, I., Ekama, G. A., Marais, G. R. (1983). A parametric model for biological excess phosphorus removal. *Wat. Sci. Technol.* 15: 127-152.

Trevor, P. (1985) *Understanding enzymes.* Ellis Horwood Publishers. Second Edition, E. U. A.



- Tsuno, H., Somiya, I., Matsumoto, M. (1987). A kinetic model for biological phosphorus removal incorporating intracellular organics and phosphorus pools. En: *Biological phosphorus removal from wastewater*. R. Ramadori (ed). Pergammon Press, E.U.A, 99-110.
- Water Environment Federation (1993). Nutrient Control. Manual of Practice FD-7. *Water Environment Federation*, E.U.A.
- Wentzel, M.C., Dold, P. L., Ekama, G.A., Marais, G.R. (1985) Kinetics of biological phosphorus release. *Wat. Sci Technol.* 17: 57-71
- Wentzel, M. C., Dold P. L., Loewenthal, R. E., Ekama, G.A., Marais, G.R. (1987) Experiments towards establishing the kinetics of biological excess phosphorus removal. En: *Biological phosphorus removal from wastewater*. R. Ramadori (ed). Pergammon Press, E.U.A., 79 – 97.
- Wentzel, M. C., Lötter, L. H., Ekama, G. A., Loewenthal, R.E., Marais, G.R. (1991) Evaluation of biochemical models for biological excess phosphorus removal. *Wat. Sci. Technol.* 23 (1/2): 567-576
- Winkler, M. (1986) *Tratamiento biológico de las aguas de desecho*, Limusa, México.
- Witherell, W. G., Nan, W. H., Uhlenbeck, C. O., (1990) Cooperative binding of R17 coat protein to RNA. *Biochemistry* 29 (50):11051-11057



APÉNDICE

TESIS CON
FALLA EN EL EXAMEN

TABLA 1. VALORES EXPERIMENTALES OBTENIDOS PARA EL CICLO DE 6H CON 30% DE FASE ANAEROBIA (2 H)

Duración total del ciclo (h)	P - PO ₄ ³⁻ (mg/l)	DQO (mg/l)	N - NH ₄ ⁺ (mg/l)	N - NO ₂ ⁻ (mg/l)	N - NO ₃ ⁻ (mg/l)	Oxígeno disuelto (mg/l)
0	7.9	239	10.8	0	0	6.0
0.5	16.2	116	9.4	0	0	0
1.0	20.7	93	9.1	0	0	0
1.5	24.7	83	9.6	0	0	0
2.0*	26.3	82	9.4	0	0	0
2.5	25.9	31	8.2	0.4	0	6.0
3.0	15.1	26	6.2	0.8	0	7.3
3.5	10.8	27	4.1	1.1	1.0	7.6
4.0	6.2	26	1.0	1.1	3.0	7.8
4.5	3.9	24	0.5	0.4	5.0	8.1
5.0	1.7	24	0	0.1	5.0	8.5
5.5	1.2	21	0	0.1	4.0	8.6
6.0	1.1	21	0	0.1	5.0	8.7

Temperatura: 19°C.

TABLA 2. VALORES EXPERIMENTALES OBTENIDOS PARA EL CICLO DE 6H CON 45% DE FASE ANAEROBIA (2.75 H).

Duración total del ciclo (h)	P - PO ₄ ³⁻ (mg/l)	DQO (mg/l)	N - NH ₄ ⁺ (mg/l)	N - NO ₂ ⁻ (mg/l)	N - NO ₃ ⁻ (mg/l)	Oxígeno disuelto (mg/l)
0	8.0	289	12.7	0	0	5.5
0.5	12.2	153	9.8	0	0	0.3
1.0	16.6	123	9.4	0	0	0
1.5	16.3	71	9.2	0	0	0
2.0	16.8	66	10.6	0	0	0
2.5	20.9	88	9.6	0	0	0
2.75*	14.0	50	9.8	0	0	0
3.0	20.7	30	8.8	0.3	0	7.7
3.5	18.6	30	6.9	1.1	0	7.7
4.0	11.4	20	4.3	2.3	5.1	7.7
4.5	7.5	20	1.0	2.5	3.4	7.9
5.0	5.9	20	0	0.9	2.6	8.2
5.5	4.0	20	0	0.3	2.5	8.4
6.0	3.6	20	0	0.1	2.0	8.6

Temperatura: 22°C

*Indica el inicio de la fase aerobia

FALLA DE CALIBRACION

TABLA 3. VALORES EXPERIMENTALES OBTENIDOS PARA EL CICLO DE 6H CON 63% DE FASE ANAEROBIA (3.75 H).

Duración total del ciclo (h)	P - PO ₄ ³⁻ (mg/l)	DQO (mg/l)	N - NH ₄ ⁺ (mg/l)	N - NO ₂ ⁻ (mg/l)	N - NO ₃ ⁻ (mg/l)	Oxígeno disuelto (mg/l)
0	8.4	224	10.3	0	0	6.5
0.5	18.7	84	8.3	0	0	0.2
1.0	24.2	49	8.2	0	0	0
1.5	23.0	42	8.2	0	0	0
2.0	27.0	55	8.2	0	0	0
2.5	16.7	37	7.4	0	0	0
3.0	32.5	33	8.2	0	0	0
3.75*	32.2	33	8.3	0	0	0
4.0	30.3	36	8.3	0.1	1	4.5
4.5	31.0	32	7.6	0.2	1	5.2
5.0	10.8	34	4.9	0.5	1	5.7
5.5	3.1	34	2.6	0.7	1	6.3
6.0	0.9	35	1.0	0.5	1	7.2

Temperatura: 21°C

TABLA 4. VALORES EXPERIMENTALES OBTENIDOS PARA EL CICLO DE 8H CON 25% DE FASE ANAEROBIA (2 H).

Duración total del ciclo (h)	P - PO ₄ ³⁻ (mg/l)	DQO (mg/l)	N - NH ₄ ⁺ (mg/l)	N - NO ₂ ⁻ (mg/l)	N - NO ₃ ⁻ (mg/l)	Oxígeno disuelto (mg/l)
0	9.4	309	11.4	0	0	3.5
0.5	12.1	234	10.9	0	0	0
1.0	11.9	164	9.1	0	0	0
1.5	13.3	130	8.6	0	0	0
2.0*	11.7	105	8.6	0	0	0
2.5	13.4	46	8.2	0.2	0	5.0
3.0	13.5	33	7.6	0.3	0.6	5.5
3.5	11.1	31	6.2	0.5	0.7	5.8
4.0	11.6	26	5.1	0.8	1.0	6.0
4.5	11.4	24	4.0	1.0	1.2	6.0
5.0	11.1	22	2.2	1.1	1.6	6.0
5.5	10.7	19	1.1	1.2	2.1	6.0
6.0	10.5	18	0.5	0.6	2.5	6.2
6.5	10.1	16	0.3	0.2	2.7	6.4
7.0	10.7	16	0.3	0.1	2.7	6.5
7.5	7.8	16	0.2	0	2.4	6.5
8.0	7.6	16	0.2	0	2.3	6.6

Temperatura: 23°C

*Indica el inicio de la fase aerobia

TESIS
FALLA

TABLA 5. VALORES EXPERIMENTALES OBTENIDOS PARA EL CICLO DE 8H CON 45% DE FASE ANAEROBIA (3.5 H).

Duración total del ciclo (h)	P - PO ₄ ³⁻ (mg/l)	DQO (mg/l)	N - NH ₄ ⁺ (mg/l)	N - NO ₂ ⁻ (mg/l)	N - NO ₃ ⁻ (mg/l)	Oxígeno disuelto (mg/l)
0	8.7	330	12.7	0	0	5.5
0.5	12.9	226	12.7	0	0	0
1.0	20.0	159	12.3	0	0	0
1.5	20.4	117	11.8	0	0	0
2.0	21.8	87	12.0	0	0	0
2.5	24.5	60	10.8	0	0	0
3.0	25.4	48	12.5	0	0	0
3.5*	24.5	33	10.6	0	0	0
4.0	20.4	23	8.2	1.4	0	5.0
4.5	14.5	18	4.7	3.3	0	5.3
5.0	9.4	28	1.0	4.9	0	5.8
5.5	7.3	22	0	3.1	1.0	6.8
6.0	5.6	18	0	0.6	2.1	7.3
6.5	4.4	22	0	0.1	1.6	7.5
7.0	3.2	25	0	0	1.5	7.7
7.5	3.3	25	0	0	1.0	7.8
8.0	2.9	20	0	0	0	7.9

Temperatura: 23°C

TABLA 6. VALORES EXPERIMENTALES OBTENIDOS PARA EL CICLO DE 8H CON 63% DE FASE ANAEROBIA (5 H).

Duración total del ciclo (h)	P - PO ₄ ³⁻ (mg/l)	DQO (mg/l)	N - NH ₄ ⁺ (mg/l)	N - NO ₂ ⁻ (mg/l)	N - NO ₃ ⁻ (mg/l)	Oxígeno disuelto (mg/l)
0	9.8	312	11.4	0	0	8.0
0.5	12.5	183	8.9	0	0	0
1.0	12.2	118	8.6	0	0	0
1.5	13.5	81	8.8	0	0	0
2.0	13.3	65	9.4	0	0	0
2.5	14.4	54	9.6	0	0	0
3.0	14.6	45	10.2	0	0	0
3.5	14.4	43	9.8	0	0	0
4.0	14.2	42	10.6	0	0	0
4.5	15.7	37	10.4	0	0	0
5.0*	15.4	35	10.6	0	0	0
5.5	12.0	35	8.6	0.4	0	6.9
6.0	9.4	32	5.6	0.9	0	7.0
6.5	7.2	37	2.9	1.5	0	7.2
7.0	5.8	35	1.0	1.6	1.0	7.3
7.5	3.4	37	0	0.5	1.1	7.5
8.0	3.5	26	0	0.1	0	7.6

Temperatura: 25°C

*Indica el inicio de la fase aerobia

TESIS
FALLA DE CARGEN

TABLA 7. VALORES EXPERIMENTALES OBTENIDOS PARA EL CICLO DE 12H CON 25% DE FASE ANAEROBIA (3 H).

Duración total del ciclo (h)	P - PO ₄ ³⁻ (mg/l)	DQO (mg/l)	N - NH ₄ ⁺ (mg/l)	N - NO ₂ ⁻ (mg/l)	N - NO ₃ ⁻ (mg/l)	Oxígeno disuelto (mg/l)
0	8.2	295	11.5	0	0	5.0
0.5	22.0	158	10.2	0	0	0
1.0	35.5	111	10.4	0	0	0
1.5	36.8	95	10.7	0	0	0
2.0	31.2	80	10.4	0	0	0
2.5	45.9	71	11.0	0	0	0
3.0*	49.8	64	11.2	0	0	0
3.5	40.7	39	8.6	0.7	< 1	6.1
4.0	35.5	43	7.8	1.2	1.6	6.4
4.5	28.6	43	6.2	1.2	3.0	6.5
5.0	17.0	37	3.3	1.0	5.5	6.6
5.5	13.9	37	< 1	1.5	6.4	7.0
6.0	10.7	34	0	0.5	8.5	7.4
6.5	8.1	30	0	0	8.1	7.5
7.0	5.7	30	0	0	8.5	7.5
7.5	5.2	32	0	0	8.6	7.5
8	4.4	34	0	0	8.0	7.5
8.5	3.9	34	0	0	8.1	7.5
9	3.5	32	0	0	8.6	7.5
9.5	3.2	32	0	0	8.5	7.5
10	3.2	32	0	0	7.8	7.5
10.5	3.3	32	0	0	8.1	7.5
11	3.7	32	0	0	8.8	7.5
11.5	3.6	32	0	0	8.6	7.5
12	3.8	32	0	0	9.1	7.5

Temperatura: 20°C

*Indica el inicio de la fase aerobia

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TABLA 8. VALORES EXPERIMENTALES OBTENIDOS PARA EL CICLO DE 12H CON 45% DE FASE ANAEROBIA (5.5H).

Duración total del ciclo (h)	P - PO_4^{3-} (mg/l)	DQO (mg/l)	N - NH_4^+ (mg/l)	N - NO_2^- (mg/l)	N - NO_3^- (mg/l)	Oxígeno disuelto (mg/l)
0	9.0	334	11.8	0	0	5.5
0.5	20.9	203	10.7	0	0	0
1.0	32.5	151	11.0	0	0	0
1.5	39.5	118	11.0	0	0	0
2.0	47.7	97	11.5	0	0	0
2.5	46.8	80	11.8	0	0	0
3.0	58.5	66	11.8	0	0	0
3.5	54.6	57	12.0	0	0	0
4.0	61.6	62	11.8	0	0	0
4.5	59.4	44	11.8	0	0	0
5.0	59.4	55	12.6	0	0	0
5.5*	45.1	50	12.3	0	0	0
6.0	63.7	39	12.0	0.1	0	4.5
6.5	54.2	37	10.4	0.4	0	5.7
7.0	34.2	41	9.1	0.6	1.0	6.6
7.5	30.7	37	7.0	1.0	1.8	7.1
8	19.0	37	4.6	1.4	2.5	7.3
8.5	13.3	39	2.3	1.4	4.4	7.5
9	7.1	37	1.0	0.7	5.8	7.6
9.5	4.2	41	0	0.2	6.2	8.0
10	3.1	41	0	0	6.4	8.6
10.5	2.9	41	0	0	6.1	8.9
11	1.8	41	0	0	6.7	9.1
11.5	1.4	37	0	0	6.4	9.3
12	1.3	39	0	0	6.6	9.4

Temperatura: 19°C

*Indica el inicio de la fase aerobia

TESTEADO
FALLA DE OXIGENO

TABLA 9. VALORES EXPERIMENTALES OBTENIDOS PARA EL CICLO DE 12H CON 63% DE FASE ANAEROBIA (7.5H)

Duración total del ciclo (h)	P - PO ₄ ³⁻ (mg/l)	DQO (mg/l)	N - NH ₄ ⁺ (mg/l)	N - NO ₂ ⁻ (mg/l)	N - NO ₃ ⁻ (mg/l)	Oxígeno disuelto (mg/l)
0	9.1	261	13.0	0	0	6.0
0.5	24.4	147	11.4	0	0	0
1.0	35.5	104	11.4	0	0	0
1.5	43.9	87	10.6	0	0	0
2.0	49.3	72	10.6	0	0	0
2.5	51.1	62	12.5	0	0	0
3.0	---	59	11.9	0	0	0
3.5	59.5	51	12.5	0	0	0
4.0	59.5	47	11.7	0	0	0
4.5	61.3	39	12.5	0	0	0
5.0	64.2	39	11.7	0	0	0
5.5	---	38	11.9	0	0	0
6.0	66.1	37	12.7	0	0	0
6.5	70.4	33	12.7	0	0	0
7.0	70.4	32	12.5	0	0	0
7.5*	67.5	34	11.9	0	0	0
8	54.1	30	11.2	0.3	0	4.5
8.5	51.1	27	10.1	0.4	0	4.7
9	32.1	37	8.0	0.8	1.2	4.9
9.5	14.8	---	5.2	1.3	1.6	5.0
10	8.7	---	2.3	1.6	2.5	5.3
10.5	4.1	34	1.0	0.7	4.7	5.6
11	2.0	38	0	0.2	4.6	6.4
11.5	1.1	35	0	0.1	4.8	6.8
12	0.8	---	0	0	4.8	7.0

Temperatura: 17°C

*Indica el inicio de la fase aerobia

TESIS CON
FALLA DE RESPON

TABLA 10 RESULTADOS OBTENIDOS PARA LOS PARÁMETROS ESTADÍSTICOS UTILIZADOS PARA LA SELECCIÓN DEL ORDEN DEL POLINOMIO PARA EL CICLO DE 6 H

Orden de polinomio seleccionado: 3

Términos de la ecuación	Duración de la fase aerobia								
	2 horas			2.75 horas			3.75 horas		
	Coef.*	Error std.**	Valor sig. "t"	Coef.	Error std.	Valor sig. "t"	Coef.	Error std.	Valor sig. "t"
Constante	1.790	0.062	0.000	2.079	0.049	0.000	2.592	0.105	0.025
T. lineal	-1.200	0.084	0.000	-0.815	0.087	0.002	-1.754	0.229	0.082
T.cuadrático	-0.033	0.028	0.288	0.041	0.037	0.348	-0.715	0.120	0.106
T.cúbico	0.098	0.026	0.013	0.099	0.046	0.123	0.163	0.207	0.575
Coef. corr*.	0.9903			0.9851			0.9946		

TABLA 11 RESULTADOS OBTENIDOS PARA LOS PARÁMETROS ESTADÍSTICOS UTILIZADOS PARA LA SELECCIÓN DEL ORDEN DEL POLINOMIO PARA EL CICLO DE 8 H

Orden de polinomio seleccionado: 3

Términos de la ecuación	Duración de la fase aerobia								
	2 horas			3.5 horas			5 horas		
	Coef.	Error std.	Valor sig. "t"	Coef.	Error std.	Valor sig. "t"	Coef.	Error std.	Valor sig. "t"
Constante	2.369	0.018	0.000	1.844	0.031	0.000	1.950	0.069	0.000
T. lineal	-0.06	0.021	0.027	-0.597	0.038	0.000	-0.634	0.122	0.014
T.cuadrático	-0.01	0.005	0.046	0.062	0.011	0.001	0.002	0.052	0.970
T. cúbico	-0.008	0.004	0.088	0.024	0.009	0.046	0.058	0.065	0.437
Coef.de corr.	0.9581			0.9928			0.9576		

TABLA 12 RESULTADOS OBTENIDOS PARA LOS PARÁMETROS ESTADÍSTICOS UTILIZADOS PARA LA SELECCIÓN DEL ORDEN DEL POLINOMIO PARA EL CICLO DE 12 H

Orden de polinomio seleccionado: 2

Términos de la ecuación	Duración de la fase aerobia								
	3 horas			5.5 horas			7.5 horas		
	Coef.	Error std.	Valor sig. "t"	Coef.	Error std.	Valor sig. "t"	Coef.	Error std.	Valor sig. "t"
Constante	1.686	0.040	0.000	1.874	0.071	0.000	2.003	0.123	0.000
T. lineal	-0.31	0.009	0.000	-0.625	0.023	0.000	-1.036	0.059	0.000
T.cuadrático	0.051	0.004	0.000	0.028	0.013	0.056	-0.083	0.041	0.095
Coef.de corr.	0.9850			0.9818			0.9800		

*Coef. = Coeficiente para los diferentes términos (constante, lineal, etc.)

Error std = Error estándar

Valor "t" = Valor significativo para la prueba t de student.

Coef. corr = Coeficiente de correlación

En todos los casos el ajuste polinomial se hizo considerando la desviación de la media, lo cual disminuye la dispersión de los valores experimentales.

Se utilizaron como criterios de selección los valores para el nivel significativo de t (valor máximo aceptable de 0.05) y los valores del coeficiente de correlación (valor mínimo de 0.95).

TESIS
FACULTAD DE CIENCIAS

TABLA 13. DESARROLLO DEL PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCIÓN DE LOS VALORES DE RAPIDEZ INICIAL DE CONSUMO DE SUSTRATO

Ciclo de 6 horas con 25% de fase anaerobia (2 h)

A partir de los valores de concentración de fósforo en función del tiempo (columna 1 y 2 de la tabla A) se obtuvo, por medio de un ajuste polinomial, la función que se indica en la tabla mencionada. El ajuste se hizo considerando valores logarítmicos de concentración de fósforo con el fin de obtener mayor precisión en los resultados.

Sustituyendo los valores de tiempo en la función polinomial, se obtuvieron valores ajustados (en escala logarítmica) de concentración de fósforo, los cuales se muestran en la columna 3 de la tabla A. Estos valores se exponenciaron, obteniéndose las concentraciones que se indican en la cuarta columna de tabla mencionada.

Tabla A. Valores experimentales y ajustados de concentración de fósforo en función del tiempo

Tiempo (h) (x)	Valores de concentración de fósforo		
	Experimentales (mg/l) (y)	Ajustados con la función polinomial: $0.0984(x-4)^3 - 0.0336(x-4)^2 - 1.2004(x-4) + 1.7907$	
		Resultado del polinomio (valor logarítmico)	Función exponencial (mg/l)
2	26.3	3.2693	26.3
2.5	25.9	3.1834	24.1
3	15.1	2.8590	17.4
3.5	10.8	2.3702	10.7
4	6.2	1.7907	5.9
4.5	3.9	1.1943	3.3
5	1.7	0.6550	1.9
5.5	1.2	0.2466	1.2
6	1.1	0.0429	1.1

El consumo total de sustrato, considerando los valores ajustados de concentración de fósforo es igual a:

$$26.3 - 1.1 = 25.2 \text{ mg/l}$$

Por lo tanto, la concentración cuando se consume 10% del consumo total de sustrato es:

$$26.3 - 2.52 = 23.7 \text{ mg/l, valor logarítmico} = 3.1683$$

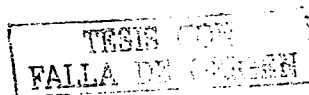
El cálculo del tiempo correspondiente a 3.1683 (23.7 mg/l), utilizando la función polinomial indicada en la tabla A es igual a:

$$0.0984(x-4)^3 - 0.0336(x-4)^2 - 1.2004(x-4) + 1.7907 = 3.1683$$

Las raíces de esta última ecuación son:

$$4.1222, -2.314, -1.4666, 8.1222, 1.686 \text{ y } 2.5334$$

Descartando las raíces negativas (tiempos negativos) y sabiendo que el tiempo debe estar entre 2 y 3 h (intervalo de tiempo en el que se encuentra 23.7 mg/l) el valor factible es **2.5334 h**.



Obtención de la rapidez de consumo de sustrato

La obtención de la rapidez inicial de consumo de sustrato se hizo por medio de la función derivada del polinomio, sustituyendo el valor de tiempo (2.53 h), como se indica a continuación:

$$y' = [\text{Exp} (0.098476 (2.53 - 4)^3 - 0.0336 (2.53 - 4)^2 - 1.2004 (2.53 - 4) + 1.7907)] \times (3 (0.09847) (2.53 - 4)^2 + 2(-0.0336(2.53 - 4) - 1.2004) = -11.08$$

El signo negativo se debe a que la rapidez es por consumo (desaparición) de sustrato. El valor obtenido representa la magnitud de la rapidez , por lo cual basta considerar valores absolutos para el análisis cinético.

Rapidez inicial de consumo de sustrato = 11.08 mg/l h

La obtención de la rapidez inicial de consumo de sustrato para las corridas restantes de 6h, así como para las de los ciclos de 8 y 12 horas se hicieron de manera similar.

TESIS EN
FALLA DE ORIGEN

Ciclo de 6 horas con 45% de fase anaerobia (2.75 h)

Tabla B. Valores experimentales y ajustados de concentración de fósforo en función del tiempo

Tiempo (h)	Experimentales (mg/l)	Valores de concentración de fósforo	
		Resultado del polinomio	Función exponencial (mg/l)
2.75	14	3.1007	22.2
3	20.7	3.0601	21.3
3.5	18.6	2.8363	17.0
4	11.4	2.4845	11.9
4.5	7.5	2.0791	7.9
5	5.9	1.6443	5.4
5.5	4.0	1.4047	4.0
6	3.6	1.2846	3.6
Consumo total de sustrato		18.6 mg/l	

Concentración cuando se consume 10% de sustrato
Valor logarítmico

20.3 mg/l
3.0132

Polinomio para la obtención del tiempo cuando se consume 10% de sustrato (20.3 mg/l):

$$+0.0991 (x-4.5)^3 + 0.0414 (x-4.5)^2 - 0.8150 (x-4.5) + 2.0791 = 3.0132$$

Raíces obtenidas: 3.1459, -2.2074, -1.3563, 7.6459, 2.2926, 3.1437

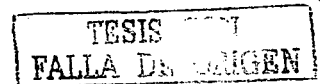
Raíz factible: **3.1437**

Obtención de la rapidez de consumo de sustrato

Valor de rapidez inicial (derivada en el punto (3.14, 20.3):

$$y' = [\text{Exp } (0.0991 (3.14-4.5)^3 + 0.0414 (3.14-4.5)^2 - 0.8150 (3.14-4.5) + 2.0791) \times 3 - (0.0991) (3.14-4.5)^2 + 2 (0.0414)(3.14-4.5) - 0.8150 = -7.73$$

Rapidez inicial de consumo de sustrato = **7.73 mg/l h**



Ciclo de 6 horas con 65% de fase anaerobia (3.75 h)

Tabla C. Valores experimentales y ajustados de concentración de fósforo en función del tiempo

Tiempo (h)	Valores de concentración de fósforo		
	Experimentales (mg/l)	Ajustados con la función polinomial: 0.1635 (x-4.85) ³ - 0.7159 (x-4.85) ² - 1.7547 (x-4.85) + 2.5923	
		Resultado del polinomio	Función exponencial (mg/l)
3.75	32.2	3.4384	31.1
4	30.3	3.4661	32.0
5.5	31.0	3.1117	22.4
5	10.8	2.3135	10.1
5.5	3.1	1.1942	3.3
6	0.9	-0.1236	0.9
Consumo total de sustrato			30.2 mg/l

Concentración cuando se consume 10% de sustrato

28.1 mg/l

Valor logarítmico

3.3362

Polinomio para la obtención del tiempo cuando se consume 10% de sustrato (28.1 mg/l):

$$0.1635 (x-4.85)^3 - 0.7159 (x-4.85)^2 - 1.7547 (x-4.85) + 2.5923 = 3.3362$$

Raíces obtenidas: 6.2193, -1.2637, -0.5786, 11.0693, 3.5863, 4.2714

Raíz factible: **4.2714**

Obtención de la rapidez de consumo de sustrato

Valor de rapidez inicial (derivada en el punto (4.27, 28.1):

$$y' = [\text{Exp } (0.1635 (4.27-4.85)^3 - 0.7159 (4.27-4.85)^2 - 1.7547 (4.27-4.85) + 2.5923)] \\ \times [3 + 0.1635 (4.27-4.85)^2 + 2 \cdot -0.7159 (4.27-4.85) - 1.7547 = -21.42$$

Rapidez inicial de consumo de sustrato = **21.42 mg/l h**

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Ciclo de 8 horas con 25% de fase anaerobia (2 h)

Tabla D. Valores experimentales y ajustados de concentración de fósforo en función del tiempo

Tiempo (h)	Valores de concentración de fósforo		
	Experimentales (mg/l)	Ajustados con la función polinomial: -0.0088 (x-5.55) ³ - 0.0142 (x-5.55) ² - 0.0665 (x-5.55) +2.3692	
		Resultado del polinomio	Función exponencial (mg/l)
2	11.7	2.8238	16.8
2.5	13.4	2.6921	14.7
3	13.5	2.5940	13.3
3.5	11.1	2.5227	12.4
4	11.6	2.4716	11.8
4.5	11.4	2.4340	11.4
5	11.1	2.4033	11.0
5.5	10.7	2.3729	10.7
6	10.5	2.3360	10.3
6.5	10.1	2.2862	9.8
7	10.7	2.2166	9.1
7.5	7.8	2.1206	8.3
8	7.6	1.9916	7.3
Consumo total de sustrato			9.5 mg/l

Concentración cuando se consume 5% de sustrato
Valor logarítmico

16.3 mg/l
2.7951

Polinomio para la obtención del tiempo cuando se consume 5% de sustrato (16.3 mg/l):

$$-0.0088 (x-5.55)^3 - 0.0142 (x-5.55)^2 - 0.0665 (x-5.55) + 2.3692 = 2.7951$$

Raíces obtenidas: -3.4579, 2.0976

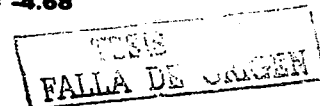
Raíz factible: **2.0976**

Obtención de la rapidez de consumo de sustrato

Valor de rapidez inicial (derivada en el punto (2.09, 16.3))

$$y' = [\text{Exp } (-0.0088 (2.09-5.55)^3 - 0.0142 (2.09-5.55)^2 - 0.0665 (2.09-5.55) + 2.3692) \\ \times 3(-0.0088) (2.09-5.55)^2 + 2(-0.0142) (2.09-5.55) - 0.0665 = -4.68$$

Rapidez inicial de consumo de sustrato = **4.68 mg/l h**



Ciclo de 8 horas con 45% de fase anaerobia (3.5 h)

Tabla E. Valores experimentales y ajustados de concentración de fósforo en función del tiempo

Tiempo (h)	Valores de concentración de fósforo		
	Experimentales (mg/l)	Ajustados con la función polinomial: +0.0240 (x-5.75) ³ + 0.0629 (x-5.75) ² - 0.5978 (x-5.75) +1.8445	
		Resultado del polinomio	Función exponencial (mg/l)
3.5	24.5	3.2342	25.3
4	20.4	2.9545	19.1
4.5	14.5	2.6431	14.0
5	9.4	2.3181	10.1
5.5	7.3	1.9975	7.3
6	5.6	1.6993	5.4
6.5	4.4	1.4417	4.2
7	3.2	1.2425	3.4
7.5	3.3	1.1199	3.0
8	2.9	1.0918	2.9
Consumo total de sustrato			22.4 mg/l

Concentración cuando se consume 5% de sustrato
Valor logarítmico

24.2 mg/l
3.1891

Polinomio para la obtención del tiempo cuando se consume 5% de sustrato (24.2 mg/l):

$$+0.0240 (x-5.75)^3 + 0.0629 (x-5.75)^2 - 0.5978 (x-5.75) + 1.8445 = 3.1891$$

Raíces obtenidas: -5.3144, 4.862, -2.1639, 0.4356, 10.612, 3.5861

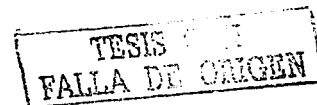
Raíz factible: **3.5861**

Obtención de la rapidez de consumo de sustrato

Valor de rapidez inicial (derivada en el punto (3.58, 24.2))

$$y' = [Exp (+0.0240 (3.58-5.75)^3 + 0.0629 (3.58-5.75)^2 - 0.5978 (3.58-5.75) + 1.8445) x + [3 + 0.0240 (3.58-5.75)^2 + 2 (0.0629) (3.58-5.75) - 0.5978 = -12.92$$

Rapidez inicial de consumo de sustrato = **12.92 mg/l h**



Ciclo de 8 horas con 65% de fase anaerobia (5 h)

Tabla F. Valores experimentales y ajustados de concentración de fósforo en función del tiempo

Tiempo (h)	Experimentales (mg/l)	Valores de concentración de fósforo	
		Ajustados con la función polinomial: $+0.0583 (x-6.5)^3 + 0.0020 (x-6.5)^2 - 0.6341 (x-6.5) + 1.9505$ Resultado del polinomio	Función exponencial (mg/l)
5	15.4	2.7097	15.0
5.5	12.0	2.5285	12.5
6	9.4	2.2608	9.5
6.5	7.2	1.9505	7.0
7	5.8	1.6412	5.1
7.5	3.4	1.3767	3.9
8	3.5	1.2007	3.3
Consumo total de sustrato		11.7 mg/l	

Concentración cuando se consume 5% de sustrato
Valor logarítmico

14.4 mg/l
2.6699

Polinomio para la obtención del tiempo cuando se consume 5% de sustrato (14.4 mg/l):

$$+0.0583 (x-6.5)^3 + 0.0020 (x-6.5)^2 - 0.6341 (x-6.5) + 1.9505 = 2.6699$$

Raíces obtenidas: 3.7466, -2.4229, -1.3593, 10.2466, 4.0771, 5.1407

Raíz factible: **5.1407**

Obtención de la rapidez de consumo de sustrato

Valor de rapidez inicial (derivada en el punto (5.14, 14.4))

$$y' = [\text{Exp} (+0.0583 (5.14-6.5)^3 + 0.0020 (5.14-6.5)^2 - 0.6341 (5.14-6.5) + 1.9505)] \times [(3 (0.0583) (5.14-6.5)^2) + (2 (0.0020) (5.14-6.5) - 0.6341] = -4.57$$

Rapidez inicial de consumo de sustrato = **4.57 mg/l h**



Ciclo de 12 horas con 25% de fase anaerobia (3 h)

Tabla G. Valores experimentales y ajustados de concentración de fósforo en función del tiempo

Tiempo (h)	Valores de concentración de fósforo		
	Experimentales (mg/l)	Ajustados con la función polinomial: (+0.0516 (x-7.5) ² - 0.3180 (x-7.5) + 1.6862) Resultado del polinomio Función exponencial (mg/l)	
3	49.8	4.1626	64.2
3.5	40.7	3.7842	44.0
4	35.5	3.4316	30.9
4.5	28.6	3.1048	22.3
5	17.0	2.8039	16.5
5.5	13.9	2.5287	12.5
6	10.7	2.2794	9.7
6.5	8.1	2.0558	7.8
7	5.7	1.8581	6.4
7.5	5.2	1.6862	5.3
8	4.4	1.5401	4.6
8.5	3.9	1.4197	4.1
9	3.5	1.3252	3.7
9.5	3.2	1.2565	3.5
10	3.2	1.2137	3.3
10.5	3.3	1.1966	3.3
11	3.7	1.2053	3.3
11.5	3.6	1.2398	3.4
12	3.8	1.3002	3.6
Consumo total de sustrato		60.5mg/l	

Concentración cuando se consume 10% de sustrato **58.1 mg/l**
 Valor logarítmico **4.0636**

Polinomio para la obtención del tiempo cuando se consume 10% de sustrato (58.1 mg/l):

$$(+0.0516 (x-7.5)^2 - 0.3180 (x-7.5) + 1.6862) = 4.0636$$

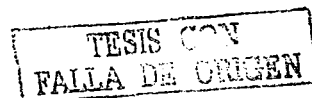
Raíces obtenidas: 10.5343, -4.3724, 18.0343, 3.1276
 Raíz factible: **3.1276**

Obtención de la rapidez de consumo de sustrato

Valor de rapidez inicial (derivada en el punto (3.12, 58.1)):

$$y' = [\text{Exp}(0.0516 (3.12-7.5)^2 - 0.3180 (3.12-7.5) + 1.6862)] \times (2 (0.0516) \times (3.12-7.5) - 0.3180) = -44.77$$

Rapidez inicial de consumo de sustrato = **44.77 mg/l h**



Ciclo de 12 horas con 45% de fase anaerobia (5.5 h)

Tabla H. Valores experimentales y ajustados de concentración de fósforo en función del tiempo

Tiempo (h)	Valores de concentración de fósforo		
	Experimentales (mg/l)	Ajustados con la función polinomial: (0.0282 (x-8.75) ² - 0.6259 (x-8.75) + 1.8746) Resultado del polinomio Función exponencial (mg/l)	
5.5	55.3	4.2070	67.1
6	47.1	3.8094	45.1
6.5	37.4	3.4259	30.7
7	21.1	3.0565	21.2
7.5	15.5	2.7012	14.8
8	11.2	2.3600	10.5
8.5	8.1	2.0329	7.6
9	5.1	1.7199	5.5
9.5	4.2	1.4210	4.1
10	2.8	1.1363	3.1
10.5	1.8	0.8556	2.3
11	2.6	0.6090	1.8
11.5	1.2	0.3665	1.4
12	1.3	0.1382	1.1

Consumo total de sustrato

66.0 mg/l

Concentración cuando se consume 10% de sustrato

60.5 mg/l

Valor logaritmico

4.1035

Polinomio para la obtención del tiempo cuando se consume 10% de sustrato (60.5 mg/l):

$$0.0282 (x-8.75)^2 - 0.6259 (x-8.75) + 1.8746 = 4.1035$$

Raíces obtenidas: 25.3151, -3.1216, 34.0651, 5.6284

Raíz factible: **5.6284**

Obtención de la rapidez de consumo de sustrato

Valor de rapidez inicial (derivada en el punto (5.62, 60.5):

$$y' = [\text{Exp} (0.0282 (5.62-8.75)^2 - 0.6259 (5.62-8.75)+1.8746)] \times (2 (0.0282) \times (5.6284 - 8.75) - 0.6259) = \mathbf{-48.57}$$

Rapidez inicial de consumo de sustrato = **48.57 mg/l h**



Ciclo de 12 horas con 63% de fase anaerobia (7.5 h)

Tabla I. Valores experimentales y ajustados de concentración de fósforo en función del tiempo

Tiempo (h)	Valores de concentración de fósforo		
	Experimentales (mg/l)	Ajustados con la función polinomial: (-0.0838 (x-10) ² -1.0368 (x-10) + 2.0030)	
		Logaritmo	Función exponencial (mg/l)
7.5	67.5	4.0711	58.6
8	54.1	3.7413	42.1
8.5	51.1	3.3696	29.0
9	32.1	2.9560	19.2
9.5	14.8	2.5005	12.1
10	8.7	2.0030	7.4
10.5	4.1	1.4636	4.3
11	2	0.8823	2.4
11.5	1.1	0.2591	1.2
12	0.8	-0.4060	0.6
Consumo total de sustrato		57.9 mg/l	

Concentración cuando se consume 10% de sustrato
Valor logaritmico

52.8 mg/l
3.9670

Polinomio para la obtención del tiempo cuando se consume 10% de sustrato (52.8 mg/l):

$$-0.0838 (x-10)^2 - 1.0368 (x-10) + 2.0030 = 3.9670$$

Raíces obtenidas: -10.0317, -2.3351, -0.0317, 7.6649

Raíz factible: **7.6649**

Obtención de la rapidez de consumo de sustrato

Valor de rapidez inicial (derivada en el punto (7.66, 52.8):

$$y' = [\text{Exp} (-0.0838 (7.66-10)^2 - 1.0368(7.66-10)+2.0030)] \times [(-1.0368)+2-0.0838 (7.66-10)] = \mathbf{-34.0891}$$

Rapidez inicial de consumo de sustrato = **34.08 mg/l h**



Tabla 14. Valores teóricos y calculados para la prueba "t" de student

Duración de ciclo (h)	Gráfica	Valores para la distribución $t_{0,95}$		Grados de libertad (n)
		Teóricos	Calculados	
6	Fig. 4.25 Gráfica (a)	1.6839	0.1230	40
	Fig. 4.25 Gráfica (b)	1.6816	-0.2109	42
	Fig. 4.25 Gráfica (c)	1.6867	0.0679	37
8	Fig. 4.26 Gráfica (a)	1.7033	0.9812	27
	Fig. 4.26 Gráfica (b)	1.7139	0.1714	23
	Fig. 4.26 Gráfica (c)	1.7613	-0.6943	14
12	Fig. 4.27	1.6669	2.6405	70

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN