

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA IZTAPALAPA

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

**"FORMACION DE BIOPELICULAS EN PARTICULAS
PLASTICAS DE POLIETILENO BAJO CONDICION
MESOFILICA EN UN REACTOR
ANAEROBIO"**

**T E S I S
PARA OBTENER LA
ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGIA**

P R E S E N T A

BIOL. ALFONSO GONZALEZ BARRERA

ASESOR: MONICA MERAZ R.

MEXICO D.F. 1995

I N D I C E

1. INTRODUCCION	1
1.1. Digestión anaerobia	2
1.1.1. Hidrólisis.....	2
1.1.2. Acetogénesis.....	3
1.1.3. Metanogénesis.....	3
1.2. Biopelícula.....	8
1.2.1. Composición.....	8
1.2.2. Etapas de la formación de las biopelículas.....	9
1.3. Características de los reactores anaerobios.....	12
1.3.1. Soportes.....	13
2. ANTECEDENTES.....	14
2.1. Inmovilización de biopelícula.....	15
3. OBJETIVOS.....	20
3.1. Objetivos generales.....	21
3.2. Objetivos específicos.....	22
4. MATERIALES Y METODOS.....	23
4.1. Condiciones del experimento.....	24
4.2. Acondicionamiento del soporte.....	25
4.3. Medio de cultivo.....	26
4.4. Características del inóculo.....	27
4.5. Operación del reactor.....	28
4.6. Determinación de la actividad acidotrófica de las partículas plásticas de polietileno.....	29

4.6.1. Toma de muestras líquidas.....	29
4.6.2. Análisis de muestras líquidas.....	30
4.7. Determinación de la actividad metanogénica	
de las partículas plásticas de polietileno.....	30
4.7.1. Toma de muestras gaseosas.....	31
4.7.2. Análisis de muestras gaseosas.....	31
4.8. Determinación de la actividad metanogénica del lodo.....	32
4.9. Curva estándar de metano.....	32
4.10. Determinación de proteína soluble.....	33
4.11. Determinación de parámetros cinéticos.....	35
4.12. Muestras para microscopía electrónica.....	36
5. RESULTADOS.....	38
5.1. Dinámica de inmovilización de las partículas	
plásticas de polietileno.....	39
5.1.1. Actividad acidotrófica.....	39
5.2. Actividad metanogénica de las partículas	
plásticas de polietileno.....	44
5.3. Determinación de proteína.....	45
5.4. Determinación de parámetros cinéticos.....	46
5.5. Microscopía electrónica.....	51
5.6. Discusión.....	51
6. CONCLUSIONES.....	56
7. BIBLIOGRAFIA.....	59
8. ANEXOS.....	62

1. INTRODUCCION

1.1. DIGESTION ANAEROBIA

La digestión anaerobia es un proceso biológico en el que se da la biodegradación de la materia orgánica hasta el producto final a metano, a través de un consorcio de microorganismos que actúan sinergeticamente a distintas velocidades, (Monroy, 1993).

El proceso de metanogénesis, se logra cuando se tienen las siguientes condiciones: a) una anaerobiosis estricta b) condiciones reductoras rigurosas con potenciales óxido reducción menores a - 330 mV, c) ausencia o cantidades mínimas de aceptores minerales finales tales como sulfatos, nitratos, ya que altas cantidades de estos, eventualmente podrían favorecer otras vías degradatorias en competencia con la metanogénesis. d) un rango de pH de 6.7 - 7.8, e) temperaturas entre 35 - 55 °C.

Dicho proceso se lleva a cabo en tres etapas:

1.1.1. HIDROLISIS

En esta primera etapa, biomoléculas polímeras como son: celulosa, pectinas, proteínas, carbohidratos y lípidos, así como moléculas de menor peso molecular, como es el caso de aminoácidos y monosacáridos, son degradados por hidrólisis y fermentación hasta alcoholes, hidrógeno, dióxido de carbono, ácidos carboxílicos como son los ácidos grasos volátiles: acetato, propionato, butirato, valerato, iso-valerato. También se producen ácidos grasos como el succinato.

Las bacterias que intervienen en esta etapa pertenecen a grupos de bacterias anaerobias estrictas o anaerobias facultativas. En el primer grupo tenemos a *Clostridium*, bacterias lácticas y propianibacterias.

En el grupo de las anaerobias facultativas se encuentran las *enterobacterias*, grupo de gran importancia porque consumen el oxígeno presente en

aguas residuales que entran a los reactores logrando las condiciones anaerobias requeridas.

1.1.2. ACETOGENESIS

En esta etapa los productos obtenidos, de las fermentaciones de la etapa anterior son convertidos en acetato, hidrógeno y dióxido de carbono, por la acción de las bacterias acetogénicas productoras obligadas de hidrógeno. OHPA. (en inglés, Obligate Hydrogen Producing Acetogens). Pero no son las únicas bacterias que producen acetato. Las que además se caracterizan por presentar tiempos de duplicación muy largos, como en el caso de *Syntrophobacter wolini* que dura 161 horas. Esta bacteria oxida el propionato a acetato, hidrógeno y bicarbonato y además crece en cocultivo con *Methanospirillum hungatei*.

En el proceso anaerobio esta etapa es sumamente importante, ya que participa un número muy reducido de microorganismos, que actúan en simbiosis (Monroy, 1993). Las reacciones de las bacterias OHPA son inhibidas por el hidrógeno que ellas mismas producen, por lo tanto el hidrógeno debe mantenerse en niveles mínimos.

1.1.3. METANOGENESIS

Esta es la etapa terminal del proceso de degradación anaerobia de la materia orgánica, todos los productos obtenidos en las etapas anteriores son transformados a metano, las bacterias involucradas en esta etapa se denominan metanogénicas y se caracterizan por ser anaerobias estrictas.

Por sus características bioquímicas se les ubica dentro del grupo de las arqueobacterias, debido a que presentan características particulares en su RNA ribosomal; RNA de transferencia, lípidos membranosos y polisacáridos de

la pared celular, que las separan de las demás bacterias a las que se denominan eubacterias.

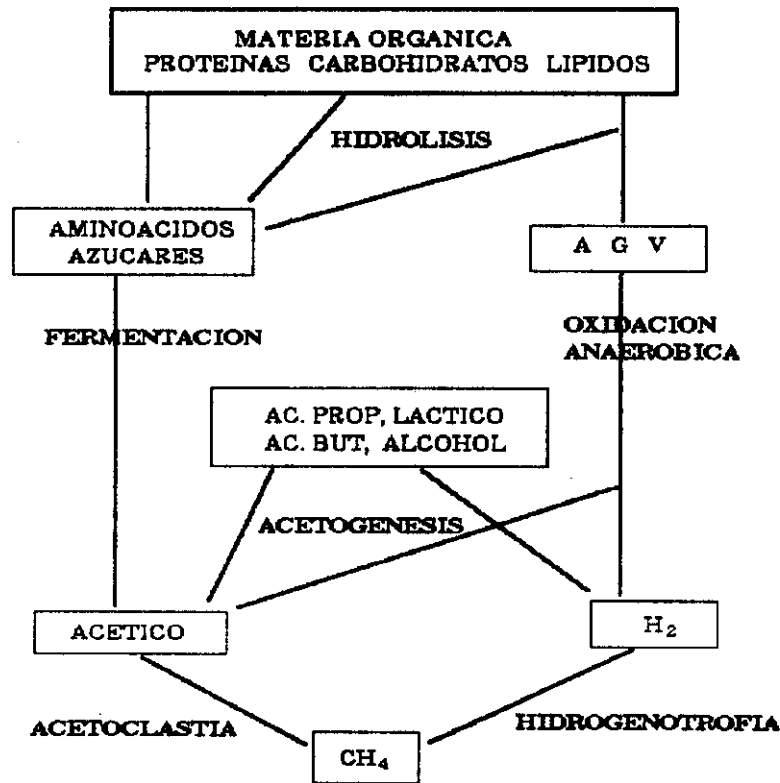


Figura 1.1.3 Esquema de la digestión anaerobia (Monroy, 1993)

Las bacterias metanogénicas tienen seis coenzimas únicas especializadas en la metanogénesis, Coenzima M o HS-CoM; el cofactor F420; la metanopterinina (MPT) o factor F342; el metanofuran; el factor F430 y el componente B o 7-mercaptoetanoiltreonina fosfato (HS-HTP). (Wolfe, 1990).

Los substratos que emplean las bacterias metanogénicas son: hidrógeno, formato, metanol, metilaminas, acetato, etanol, propanol-2 y ciclopentanol. A su vez se subdividen en:

- 1) Bacterias hidrogenofílicas no acetoclásticas

Se caracterizan por oxidar el hidrógeno en presencia de dióxido de carbono como aceptor de electrones. Y no pueden utilizar el acetato como fuente de energía, las bacterias hidrogenofílicas que por lo general son metanogénicas actúan en simbiosis con las OHPA y evitan la acumulación del hidrógeno ya que lo consumen continuamente. Sin embargo si el medio contiene sulfatos, las bacterias sulfato-reductoras (BSR) sustituyen a las metanogénicas. De acuerdo a Guyot (1992) si el medio no contiene sulfatos, ciertos grupos de bacterias BSR también son capaces de establecer una relación simbiótica con las bacterias metanogénicas hidrogenofílicas de la misma manera que las bacterias OHPA.

En resumen la relación que se da entre las bacterias OHPA que producen hidrógeno y las hidrogenofílicas que lo consumen se denomina "transferencia interespecies de hidrógeno", este fenómeno es de vital importancia para entender los fenómenos de regulación de la digestión anaerobia.

Especies de bacterias que participan en esta etapa:

Bacterias OHPA

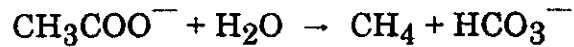
- Syntrophobacter wolinii* (Boone y Bryant, 1980)
- Syntrophomonas sapovorans* (Roy y col., 1986)
- Syntrophomonas wolfei* (Mc. Inerney y col., 1981)
- Syntrophospora bryantii* (Stieb y Schink, 1985, Zha o y col., 1990)
- Syntrophus buswellii* (Mountfort, 1984)

Bacterias homoacetogénicas

- Acetobacterium woodii* (Balch y col., 1977)
- Clostridium farmicoaceticum* (Andreisen y col., 1970)
- Bacterias que utilizan acetato como fuente de carbono
- Methanobacterium formicicum* (bacilos)
- Methanobacterium thermoautotrophicum* especie termofílica, (bacilos largos)
- Methanobrevibacter* sp (pequeños bastoncitos)
- Methanospirillum hungatei* (filamentos largos)

2) Bacterias metanogénicas acetoclásticas

Forman metano a partir del grupo metil del acetato de acuerdo a la ecuación:



$$\Delta G^\circ = -31 \text{ Kj/reacción}$$

El 73 % del metano que se produce en los digestores anaerobios proviene del acetato, por lo que esta reacción es sumamente importante.

Este grupo de bacterias comprende dos generos:

1.- *Methanosarcina*: son seudosarcinas que tienen una baja afinidad por el acetato. Tienen un Km para el acetato del orden de 5 mM y presentan tiempos generacionales de 30 horas. Las especies mas representativas son: *Methanosarcina barkeri*; *M. mazei*; *M. thermophila*. Por otra parte pueden ser inhibidas por el hidrógeno y el formato y dependiendo de la especie además del acetato pueden utilizar como fuente de energia y de carbono las metilaminas, el metanol y algunas el hidrógeno (Guyot, 1992).

2.- *Methanotherix*: son bacilos que forman largos filamentos, faciles de identificar al microscopio. Tienen un Km para el acetato entre 0.7 y 1.2 mM. Tiempos de generación entre 65 y 70 horas. Las bacterias de este género no utilizan el hidrógeno y el formato, así como el metanol y las metilaminas. No son inhibidas por el hidrógeno y el formato. En general, los lodos granulares de los reactores UASB contienen un alto contenido de estas bacterias (Guyot, 1992).

TABLA 1.1.3. BACTERIAS METANOGENICAS (García, 1983)	
Género	Especie
<i>Methanobacterium</i>	<i>bryantii</i> <i>formicicum</i> <i>thermoautotrophicum</i>
<i>Methanobrevibacter</i>	<i>arboriphilus</i> <i>smithii</i>
<i>Methanococcus</i>	<i>deltae</i> <i>maripaludis</i> <i>thermolithotrophicus</i> <i>vanniellii</i>
<i>Methanomicrobium</i>	<i>mobile</i>
<i>Methanogenium</i>	<i>cariaci</i> <i>thermophilicum</i> <i>tatii</i>
<i>Methanolobus</i>	<i>tindarius</i>
<i>Methanococcoides</i>	<i>methylytens</i>
<i>Methanospirillum</i>	<i>hungatei</i>
<i>Methanosarcina</i>	<i>acetivorans</i> <i>barkeri</i> TM1 <i>mazei</i>
<i>Methanotherix</i>	<i>soehngenii</i> <i>sp. (thermophile)</i>
<i>Methanoplasma</i>	<i>elizabethii</i>

1.2 BIOPELICULA

Los diferentes grupos de bacterias comprendidos dentro de las etapas hidrolítica, acetogénica y metanogénica se asocian entre si y forman biopelículas las que pueden tener arreglos estructurales y funcionales muy complejos.

Una biopelícula, es una capa compuesta por un gran número de especies de microorganismos, que están en íntimo contacto unas con otras, donde se da una interdependencia mutua, por lo que actúan en armonía en forma de consorcio. En condiciones naturales las biopelículas se forman en superficies que están en contacto con medio nutritivo acuoso y en donde también se encuentran microorganismos suspendidos, los cuales se adhieren a las superficies y forman biopelículas. Este principio se utiliza para inducir la formación de biopelículas en reactores anaerobios a fin de tratar aguas residuales de muy diferente origen.

1.2.1. COMPOSICION

Esencialmente las biopelículas están formadas por microorganismos de diversas especies que quedan embebidos en sustancias exopoliméricas que ellos mismos producen, formando una matriz altamente hidratada que llega a contener hasta 99 % de agua y que contiene principalmente polisacáridos poliiónicos altamente hidratados y con un arreglo estructural, complejo y también contiene glicoproteínas globulares (Costerton, et al 1981).

Muy recientemente se ha propuesto que en la matriz también se encuentran lipopolisacáridos, que eventualmente interactúan con las proteínas (Guiot, 1992).

Los polisacáridos pueden ser homopolímeros muy simples o bien heteropolímeros muy complejos que abarcan una amplia variedad de monosacáridos como pueden ser: hexosas neutras, 6-deoxihexosas, polioles, ácido uróni

co, ácido hialurónico y aminoazúcares (Costerton, et al 1981 y Guiot, 1992).

Tan pronto como las bacterias se adhieren a la superficie empiezan a producir sustancias exopoliméricas en forma de fibras. Dicho material puede tener varios arreglos: 1) en capas periféricas 2) en forma de cápsulas rodeadas de material fibroso 3) fibras desorganizadas formando una matriz 4) como material amorfo entrelazado entre las células.

1.2.2. ETAPAS DE LA FORMACION DE LAS BIOPELICULAS

De acuerdo a (Guiot, 1992) la formación de biopelículas comprende varias etapas:

- 1) fijación de moléculas orgánicas a la superficie de soporte,
- 2) transporte de células bacterianas a la superficie,
- 3) adhesión de las bacterias al material inerte así como la adhesión de unas con otras. (Esta etapa se conoce como adhesión reversible, ya que en esta etapa todavía se pueden separar fácilmente),
- 4) fijación permanente debido a la elaboración de sustancias exopoliméricas que favorecen la formación de la matriz en la que quedan embebidos los microorganismos,
- 5) desarrollo de la biopelícula como resultado del crecimiento de los microorganismos,
- 6) desprendimiento de partes de biopelícula debido a la fuerza del líquido o esfuerzos cortantes y por fricción dinámica

- 1) Fijación de moléculas orgánicas a la superficie de soporte,

Cualquier superficie expuesta a un líquido que contiene macromoléculas orgánicas es susceptible de ser colonizada, por la formación de una mono capa orgánica sobre dicha superficie. Esta película primaria de moléculas orgánicas, modifica las propiedades fisicoquímicas de dicha superficie, e influye

la naturaleza química del soporte y que el material de soporte presente superficies rugosas y porosas ya que son condiciones esenciales para la inmovilización. (Guiot, 1992).

2) Transporte de células bacterianas a la superficie,

En esta etapa ocurre un transporte físico de los microorganismos que se encuentran en suspensión en el líquido hacia la superficie que previamente quedó cubierta con una película de moléculas orgánicas. El arrastre hacia dicha superficie se debe a la difusión molecular de los microorganismos y al transporte turbulento que experimentan por la fuerza del líquido. El flujo de las micro partículas hacia la superficie esta en función de su concentración y en función de los incrementos en la velocidad de flujo del líquido, aunque también influyen su tamaño, forma y densidad (González, 1990).

3) Adhesión de las bacterias al material inerte así como la adhesión de unas con otras.

Esta etapa se conoce como adhesión reversible y se produce por una adhesión inicial débil de las bacterias a la superficie. En esta etapa aún exhiben movimiento browniano y pueden desprenderse fácilmente mediante agitación.

4) Fijación permanente debido a la elaboración de sustancias exopoliméricas.

En esta etapa las bacterias sintetizan sustancias exopoliméricas extracelulares que determinan la formación de una matriz que envuelve completamente a los microorganismos, y que los fija a la superficie del soporte, lo que forma la matriz acarreadora donde se encuentran los microorganismos y forma la biopelícula.

5) Desarrollo de la biopelícula como resultado del crecimiento de los microorganismos.

La producción de biomasa sobre la superficie es el resultado de la división celular. Así mismo el crecimiento y grosor de una biopelícula depende de una serie de parámetros como son: pH, temperatura, concentración de nutrientes limitantes, tipo de nutrientes, aceptor final de electrones y la concentración de microorganismos. La disminución de la concentración de nutrientes origina películas delgadas. Igualmente influye la velocidad superficial del líquido circundante.

6) Desprendimiento de partes de biopelícula debido al flujo del líquido que produce esfuerzos cortantes

Las biopelículas, sin importar la fase de desarrollo en que se encuentren, pierden porciones de sí misma, entre otras causas debido a la fuerza del líquido o bien por la muerte de microorganismos que las forman. En estado de equilibrio la cantidad de biopelícula desprendida debe ser igual a la cantidad de biopelícula producida.

Factores que favorecen la rápida formación de biopelículas en los reactores anaerobios son: tipo de soporte, oxigenación inicial del medio, a fin de favorecer la formación de una fina capa de moléculas poliméricas orgánicas en el soporte antes de que se inicie el desarrollo de las capas anaerobias.

Inocular durante una larga etapa, con una alta cantidad de inóculo. Fertilizar con elementos traza, como Fe, Ni. Mantener constante la temperatura del medio a 35 °C. Agregar al medio azúcar o dextrosa para favorecer la producción de sustancias exopoliméricas. Buscar un balance óptimo entre la velocidad superficial del líquido que incide en la biomasa y ocasiona su desprendimiento.

1.3. CARACTERISTICAS DE LOS REACTORES ANAEROBIOS

Una importante alternativa en el tratamiento de aguas residuales se tiene al utilizar reactores anaerobios. Esto se debe al avance logrado en la última década sobre las bases microbiológicas, cinéticas y estequiométricas del proceso anaerobio, así como al desarrollo tecnológico en el diseño y operación de los reactores anaerobios.

Estos factores en su conjunto han permitido que los reactores anaerobios puedan ser utilizados en el tratamiento de efluentes cada vez más diversos, como son: urbanos, agrícolas e industriales, aunque contengan elementos tóxicos e inhibidores.

Con mucho éxito se han podido emplear cuando se tienen altas cargas orgánicas de hasta 15 - 20 Kg DQO/M³.d, o bien en efluentes muy diluidos como aguas residuales urbanas con concentraciones inferiores a 500 mg. DQO/L (Lema, 1993).

En los primeros reactores anaerobios diseñados, la biomasa es retenida en suspensión y se caracterizaron por tener tiempos de retención hidráulica y tiempos de retención de substratos largos (desde 4 hasta más de 30 días) por lo que son reactores sumamente grandes.

A partir de una segunda generación en reactores es posible inducir la formación de biopelícula en soportes inertes a través de su sedimentación. En estos reactores se mantienen altos tiempos de retención celular independientes del tiempo de residencia hidráulica, los que disminuyen a intervalos de 0.5 a 3 días. El reactor UASB reactor de lecho de lodos con flujo ascendente (Upflow Anaerobic Sludge Blanket) pertenece a esta generación de reactores, desarrollado por (Lettinga y col. 1980).

Los reactores de tercera generación también retienen los microorganismos en forma de biopelícula, ya sea en soportes fijos o en soportes suspendi-

dos en forma de partículas. Entre ellos se encuentra el reactor de lecho expandido y el de lecho fluidizado. De estos últimos se tienen dos modalidades: en los primeros el líquido circula de abajo hacia arriba y se empleaban soportes de alta densidad por lo que, para fluidificarlos se requieren altas velocidades de flujo del líquido lo que representa un considerable gasto energético.

En el reactor de lecho fluidificado invertido el líquido circula de arriba hacia abajo y se emplean soportes de baja densidad, con el consiguiente ahorro de energía. En esta generación de reactores se logran tiempos de retención hidráulica menores a 12 horas y son mas chicos comparados con los de generaciones anteriores. (Noyola, 1990).

1.3.1. SOPORTES

Los soportes permiten aumentar la superficie de colonización pueden ser fijos o suspendidos y por lo tanto fluidificables. Si son fijos se emplean soportes en forma de placas o empacados con partículas esféricas o irregulares cuando se fluidifican, además permiten una distribución uniforme de la biomasa en la zona de expansión del reactor.

Inicialmente en los reactores de flujo ascendente se utilizarón soportes de alta densidad como por ejemplo arena, arcilla. Posteriormente en los reactores de flujo descendente se han utilizado soportes de baja densidad como son nylon, polietileno, poliéster, etc.

Se a visto que la naturaleza química del soporte es mas importante que su estructura física ya que si el material presenta poros y rugosidades la biopelícula podrá adherirse mas fácilmente en dichas partes. Además el tamaño del poro y el porcentaje del mismo son factores que influyen en la adhesión de la biopelícula. (Guiot, 1992) considera que un diámetro ideal de los poros es de 0.4 mm de diámetro.

2. ANTECEDENTES

2.1. INMOVILIZACION DE BIOPELICULA

En 1986 Shapiro y Switzenbaum estudian la forma de promover un rápido crecimiento de la flora metanogénica sobre las paredes de tubos de silicon y por consiguiente lograr la pronta formación de biopelícula en reactores anaerobios y con esto reducir el tiempo que tardan en estabilizarse los reactores durante el arranque. Encuentra que las tasas de acumulación de flora metanogénica y biopelícula aumentan sensiblemente cuando se incrementa carga orgánica líquida y espacial cuando se aplican altas concentraciones de sólidos suspendidos volátiles.

Las etapas iniciales de la formación de biopelícula en partículas de arena, con un diámetro de 0.1-0.3 mm. y densidad de 2.6 g/cm³, fue estudiada por (Gorris, y col. 1989), en reactores anaerobios metanogénicos de lecho fluidificado. Observó que la etapa inicial de arranque del reactor describe una curva sigmoide donde se identifican tres fases: 1) la fase de lento crecimiento de la flora bacteriana, 2) la fase de producción de biopelícula que persiste hasta que ya no hay incremento en la tasa de remoción de la carga orgánica y 3) la fase estacionaria, en donde se mantiene constante la tasa de remoción de materia orgánica y ya no hay incremento en el espesor de la biopelícula.

En todos los casos la biopelícula inmovilizada es similar, los diferentes inóculos aplicados no influyen en la composición de la misma de donde deducen la importancia de las condiciones ambientales que se tengan en el reactor, especialmente nutrientes, aunque también influyen el área superficial y la velocidad a la que circula el agua en el reactor. En las películas obtenidas siempre encuentran un predominio de bacterias similares a *Methanothrix*.

En el estudio realizado por (González, y col. 1992) se induce la formación de película microbiana bajo condición anaerobia empleando reactores de lecho fluidificado invertido. El sistema completo estaba formado por un reactor anaerobio con capacidad de 125 ml, unido a un sedimentador y a una bomba peristáltica que hacia circular el líquido a una velocidad superficial de 2 m/h. Durante el experimento los reactores se inoculaban con 120 ml de lodo anaerobio de 55.3 SSV/l procedente de un reactor UASB y los reactores fueron alimentados con medio mineral (Balch y col. 1979). Se utilizó polietileno molido con un diámetro aproximado de 0.149 mm y un total de 25 g.

Las partículas de polietileno comparadas con placas ofrecen mayores ventajas debido a que presentan una mayor superficie específica para la colonización de los microorganismos. Las partículas ofrecen superficies rugosas lo que también facilita la adhesión de las películas y debido a la baja densidad de dicho material (0.64 g/cm^3) las partículas pueden ser fácilmente fluidificadas, con una velocidad superficial del líquido de 2 m/h.

TABLA 2.1. ACTIVIDAD ESPECIFICA DE BIOPARTICULAS Y PLACAS FIJAS				
SOPORTE	DIA	$\mu\text{mol CH}_4$ mg SST · h	$\mu\text{mol CH}_4$ $\mu\text{g prot} \cdot \text{h}$	$\mu\text{mol CH}_4$ $\text{cm}^2 \cdot \text{h}$
MOLIDO	71	0.024	58.02	2.628
	101	0.026	72.46	2.97
PLACA	DIA	/mg SSV		
	71	12.7	27.86	2.29
	101	14.9	58.80	2.97

Los resultados obtenidos muestran que se logra formación de bio-película en los soportes fijos de polietileno así como en partículas. Durante el tiempo que dura el experimento se da una actividad acetoclástica que va en

aumento hasta hacerse estable, así mismo la actividad propionoclástica y butiroclástica también va aumentando gradualmente hasta hacerse estable.

Se aprecia que la actividad específica de las biopartículas a los 101 días es de $0.026 \mu\text{mol}\cdot\text{CH}_4/\text{mg}\cdot\text{SST}\cdot\text{h}$, este valor toma en cuenta el soporte y la biomasa, ya que se reporta la imposibilidad de separarlos (ver tabla 2.1.).

Posteriormente, Meraz y col. (1993) inducen la inmovilización de bacterias anaerobias bajo condición termofílica, siguiendo una metodología parecida a la desarrollada por González y col. (1992). Utilizan un reactor de lecho fluidificado invertido con una capacidad de 300 cm^3 y fluidifican en el reactor 100.53 cm^3 de partículas plásticas de polietileno de baja densidad, con un diámetro aproximado de 0.56 mm . y con una densidad aparente de 267 kg/m^3 . El sistema se fluidificó a una velocidad superficial del líquido de 9.0 m/h . Para la inoculación utilizaron un lodo anaerobio mesofílico especialmente adaptado a termofilia con acetato, propionato y butirato en proporciones 500:250:250 mg de DQO/L.

A los 30 días de iniciado el experimento, encuentran que hay actividad acidogénica y metanogénica lo que indica la formación de una película en las partículas plásticas de polietileno y la biomasa inmovilizada alcanza un valor de $150 \mu\text{g proteína/g soporte seco}$. Y encuentran que en la relación C/N de 300 se da una actividad metanogénica de $21.0 \text{ mili mol CH}_4/\text{g proteína, día}$, y un rendimiento $\text{CH}_4/\text{Acetato}$ de 1.3787.

A bajas relaciones C/N 30 se tiene producción de metano, pero se presenta una fuerte acumulación de acetato. A una relación C/N 3, también hay acumulación de acetato, pero obtienen una producción de metano de 14.84 milimol cuando se adiciona acetato al medio. Sin acetato obtienen 5.0425 milimol . Con los resultados que obtienen aconsejan rediseñar el sistema empleado

a fin de lograr una mayor anaerobiosis y obtener rendimientos mas altos en la producción de metano.

Meier-Schneiders y col. (1993) estudia la forma en que bacterias como *P. aeruginosa* y *C. amalonaticus* se adhieren a las superficies con el fin de optimizar el tiempo de arranque de un reactor anaerobio de biopelícula a escala, comparada con la fijación cuando no se emplean este tipo de substratos. En cultivos puros de *M. barkeri* no se observa formación de biopelícula que se adhiere a superficies hidrofílicas de vidrio. En cambio cultivos mixtos con *C. amalonaticus*, se observa una adhesión primaria de estas bacterias seguida de una adhesión secundaria de *M. barkeri*. Este mecanismo sugiere que se requiere una biopelícula ya formada para la fijación de *M. barkeri*.

La forma en que el inóculo influye en la formación inicial de biopelícula es estudiada por Zellner y col. (1994) Utilizan 5 reactores anaerobios de lecho fijo, son operados en paralelo bajo idénticas condiciones, a una temperatura de 35 °C. El reactor fue alimentado con medio sintético que contenía una relación 100:50:50 de acetato, propionato y butirato Como material de soporte utilizaron poli propileno (NOR-PAC R 92/1) en forma ondulada.

Los reactores fueron inoculados durante 2 meses, con lodos anaerobios de diferentes fuentes. Los resultados que obtienen demuestran diferentes rendimientos en los reactores, el reactor inoculado con lodo anaerobio adaptado al agua residual fue el que alcanzó la más alta carga orgánica 21 g COD/l·d después de 58 días de iniciado el experimento. El inóculo menos eficiente fue el lodo procedente de un reactor UASB. Por lo que aconsejan tener en cuenta las relaciones entre el tipo de inóculo así como el tipo de reactor, y las características de las aguas residuales, si se quiere tener una rápida formación de biopelículas.

cula, lo que repercute en una breve etapa de arranque y una pronta estabilización de los reactores anaerobios. También encuentran que el grosor de la película varia de 20-200 μm lo que también depende del tipo de inóculo. En todos los lodos que prueban la especie predominante es *Methanothrix*.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVOS GENERALES

- **Formar biopelículas en partículas plásticas de polietileno en mesofilia (35 °C) en un reactor de lecho fluidificado invertido, utilizando un lodo anaerobio como inóculo.**

3.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Hacer una evaluación de la actividad acidotrófica durante el proceso de inmovilización de la biomasa fijada en las partículas plásticas de polietileno.
2. Determinar la actividad metanogénica y acidoclastica de partículas completamente inmovilizadas.
3. Determinar la cantidad de biomasa adherida como proteína soluble
4. Conocer la K_s (Constante de saturación ó constante de afinidad del sustrato) y $V_{m\acute{a}x}$ (velocidad máxima de degradación del sustrato) de la biopelícula formada en las partículas de polietileno
5. Hacer estudios de microscopía electrónica de barrido a las partículas inmovilizadas.

4. MATERIALES Y METODOS

4.1. CONDICIONES DEL EXPERIMENTO

El presente estudio se realizó a una temperatura de $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se utilizó un sistema que constaba de las siguientes partes: un reactor de lecho fluidificado invertido en el que se colocaba polietileno molido como material de soporte, un sedimentador y una bomba peristáltica (ver figura 4.1).

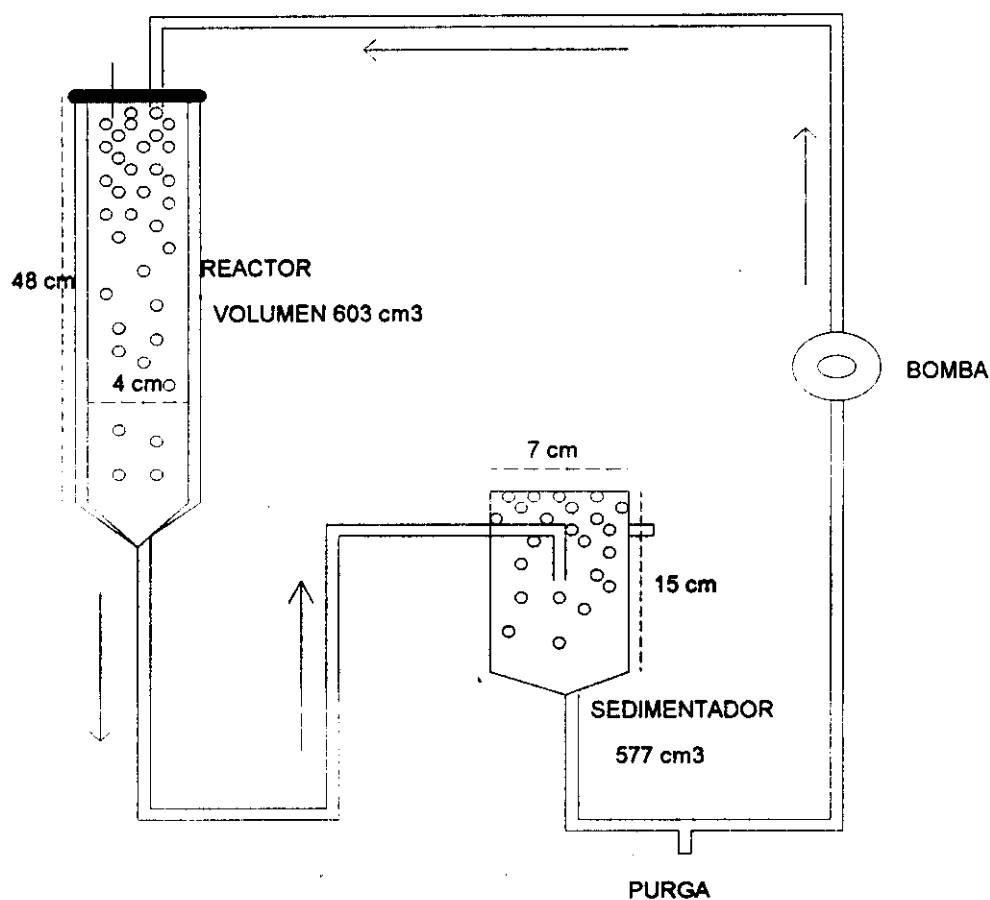


FIGURA 4.1 REACTOR DE LECHO FLUIDIFICADO INVERTIDO

En la tabla 4.1. se listan las dimensiones y características del reactor, sedimentador, soporte, bomba e inóculo. En este sistema el líquido circula de arriba hacia abajo lo que ocasiona la expansión del lecho de partículas de

polietileno, que debido a su baja densidad flotan en la parte más alta del reactor. Posteriormente el medio sigue su curso hasta llegar al sedimentador que actúa como una trampa al atrapar a las partículas arrastradas por el movimiento del líquido lo que impide la llegada de éstas a la bomba evitando su obstrucción.

TABLA 4.1.	
.CARACTERISTICAS DEL SISTEMA	
REACTOR	CARACTERISTICAS
Largo	48 cm
Ancho	3.7 cm
Volumen	603 cm ³
SEDIMENTADOR	
Largo	15 cm
Ancho	7 cm
Volumen	577 cm ³
SOPORTE	
Cantidad	155 cm ³
Densidad aparente	267 Kg/m ³
Diámetro partículas	0.56, 0.42, 0.28 mm.
BOMBA	
Velocidad de flujo	9 m/h
INOCULO	
Densidad	21 g SSV/l
Cantidad	2.1 g SSV/l

4.2. ACONDICIONAMIENTO DEL SOPORTE

Las partículas utilizadas como material de soporte se obtuvieron de la trituración de lentejas de polietileno. La distribución de tamaños de este material se lista en la tabla 4.2.

De esta mezcla se pesaron 25.26 g. que se sometieron a una agitación vigorosa en una solución de peptona de caseína, el tratamiento dura de una a

dos horas. Después de lo anterior la mezcla se drena y se deposita en el reactor. Se logró una expansión del lecho de partículas de polietileno de aproximadamente el 50 %.

TABLA 4.2. MEZCLA DE PARTICULAS DE POLIETILENO	
Diámetro. mm	%
0.56	75.5
0.42	24.0
0.28	0.5
peso total	25.26 g.

4.3. MEDIO DE CULTIVO

El medio utilizado a lo largo del experimento fué el de Balch y col. (1979) para bacterias metanogénicas acetoclásticas, el cual fue empleado para alimentar las películas bacterianas del reactor y el lodo.

Sol. conc. (4) Mineral 1 de Balch, et al (1979)	10 ml/l
Sol. conc. (4) Mineral 2 de Balch, et al (1979)	10 "
Sol. conc. (10) Vitaminas, Balch, et al (1979)	1 "
Sol. conc. (10) NiCl ₂ (50 mg/l)	1 "
Sol. FeSO ₄ ·7H ₂ O (0.2%)	1 "
Sol. conc. (4) Oligoelementos, Balch, et al (1979)	2.5"
Extracto de levadura	1 g/l
Peptona de caseína	1 "
Bicarbonato de sodio	2 "
Acetato de sodio	8 "

NOTA: Las soluciones marcadas con (4) y (10) se emplearon en concentraciones de 4 y 10 veces, respectivamente. Todas las soluciones se mantienen en refrigeración.

Por otra parte, también se utilizó el medio reducido de Balch y col. (1979) este fué empleado para hacer las determinaciones de actividad metano-

génica y actividad acetotrófica de las biopelículas formadas en las partículas plásticas de polietileno, así como para la actividad metanogénica del lodo. La forma de preparar el medio reducido es la siguiente: de la formulación del medio de Balch y col (1979) para bacterias metanogénicas acetoclásticas, se excluye el acetato de sodio y se siguen empleando las mismas soluciones y cantidades del medio y los reactivos que se modifican en concentración son:

Extracto de levadura-----0.1 g/l

Peptona de caseína-----0.1 "

y además se adiciona el reactivo indicador:

Resazurina (0.1%)-----1.0 ml

Los componentes del medio se colocan en un matraz y se adicionan 1200 ml de agua destilada, se hierve bajo corriente de N_2 , se deja consumir el agua hasta que alcance el nivel de 1000 ml, se enfría y se agrega 0.5 g/l de cisteína a fin de eliminar el O_2 remanente lo que ocasiona vire el colorante a rosa. Posteriormente bajo corriente de N_2 se vacía el medio en botellas serológicas colocando en cada una de ellas 20 ml. En seguida se tapan se anillan y se les hace cambio de atmósfera. con una mezcla de N_2 - CO_2 en proporción 80-20% durante dos minutos. Por último se esteriliza el material durante 15 minutos a 1 atm. de presión.

4.4. CARACTERISTICAS DEL INOCULO

El inóculo empleado fue un lodo mesofílico procedente de una fábrica de levadura. Dicho lodo se mantuvo en condiciones óptimas ya que se alimentó cada 15 días con el medio de (Balch y col. 1979) descrito en la sección anterior, y a fin de promover el crecimiento preferencial de *Methanosarcina* respecto a otras especies como podría ser *Methanothrix*, adicionalmente se le agregó 1 ml/l de metanol. (Meier-Schneiders, y col. 1993). Por otra parte las

concentraciones de peptona y de extracto de levadura fueron: 0.1 g/l y se le agregó 3 g /l de acetato de sodio.

La densidad del lodo fue de 21 g SSV/l y presentó una actividad metanogénica específica de 0.42 mmol CH₄/gSSV·h. La cantidad empleada para inocular el reactor fue de 2.1 g SSV/l.

4.5. OPERACION DEL REACTOR

Inicialmente en el reactor se colocó la mezcla de partículas de plástico de polietileno descrita en 4.2. El reactor funcionó en lote y cada tercer día se le cambió el medio descrito en 4.3 por medio fresco. En la etapa inicial la cantidad de inóculo que se adicionó fue de 4.2 g SSV/l de lodo mesofílico. Por otra parte al medio de Balch se le hicieron las siguientes modificaciones: se empleo 1 g/l tanto de extracto de levadura así como de peptona de caseína que actúan como fuente de nitrógeno carbono y vitaminas, por otro lado se agregó 0.5 g/l de glucosa ya que favorece la producción de sustancias exopoliméricas. Por otra parte en virtud de que la biopelícula se encuentra en proceso de formación el consumo de acetato es mínimo por lo que solamente se utilizó 0.5 g/l.

En la operación del reactor se ajustaba diariamente el pH a 7 ya que los microorganismos que se encuentran formando la biopelícula al degradar los sustratos del medio producen alcalinización.

A los 30 días se efectúa una prueba de DQO la que demuestra que la biopelícula mas el inóculo, agotan el 40% de la carga orgánica presente en el medio.

Por lo que se modifican las condiciones de operación del reactor y a partir de este momento se reducen las cantidades de extracto de levadura y peptona de caseína a 0.1 g/l. Esta formulación del medio se conservó hasta el final del experimento. En todo el tiempo el reactor fué operado a 35 °C±2 °C.

4.6. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ACIDOTROFICA DE LAS PARTICULAS PLASTICAS DE POLIETILENO.

Esta prueba permite hacer una evaluación cuantitativa de la velocidad con que las películas bacterianas degradan acetato. La prueba en cuestión se desarrolla de la siguiente manera:

La cinética consta de un grupo de botellas serológicas utilizadas como control sin acetato y un grupo experimental con 10 mM de acetato. Cada grupo contiene tres replicas. Cada replica es preparada en botellas serológicas, a las que se les agregan 20 ml de medio reducido de (Balch y col. 1979) y 5 ml de partículas plásticas de polietileno tomadas previamente del reactor. Estas se miden con ayuda de una probeta de 100 ml con "cola de rata" en el extremo inferior para drenar el líquido. Las partículas se adicionan a las botellas serológicas en la cámara anaerobia. Fuera de la cámara a todas las replicas se les agregan 0.25 ml de NaS_2 1.75 M^(1*). La cinética se inicia cuando a las replicas del grupo experimental se les adiciona 10 mM de acetato.^(1*).

La cinética se inicia al tiempo cero y se tomó muestra cada 24 horas, a cada tiempo se toma muestra líquida de cada una de las replicas.

4.6.1. TOMA DE MUESTRAS LIQUIDAS

De cada replica se toman 0.5 ml de la fase líquida con jeringa desechable, purgada previamente en corriente de nitrógeno, evitando turbulencias en los plásticos. La muestra se deposita en un vial al que previamente se le agrega 15 μl de ácido fórmico al 3.0% y se congela para su análisis posterior

1

^{1*} Ver en el anexo la formulación de estas sustancias

4.6.2. ANALISIS DE MUESTRAS LIQUIDA

Cada muestra líquida es analizada por cromatografía de gases en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890, con detector de ionización de flama en una columna de acero inoxidable empacada con AT-1000 a las siguientes condiciones: temperatura del inyector 210 °C, temperatura de la columna 180 °C, temperatura del detector 210 °C, flujo de nitrógeno 30 ml/min., flujo de aire 300 ml/min., flujo de hidrógeno 30 ml/min y volumen de inyección 2 µl.

La actividad acetotrófica de las partículas es la pendiente de la curva de consumo de acetato y se reporta por medio del siguiente cálculo:

$$\frac{\text{mmol acetato}}{\text{l fase líquida} \cdot \text{h}} \times \frac{0.0051 \text{ fase líquida}}{\text{g. spte. seco}} \times \frac{\text{g. spte. seco}}{\mu\text{g. proteína}} = \frac{\text{mmol acetato}}{\mu\text{g proteína} \cdot \text{h}}$$

ó

$$\frac{\text{mmol acetato}}{\text{l fase líquida} \cdot \text{h}} \times \frac{0.0051 \text{ fase líquida}}{\text{g. spte. seco}} \times \frac{\text{g. spte. seco}}{\text{mg SSV}} = \frac{\text{mmol acetato}}{\text{mg. SSV} \cdot \text{h}}$$

En donde mmol acetato fase líquida·h es la pendiente del máximo consumo de acetato de la cinética acetoclástica. Pero puede ser convenientemente expresada en µmol acetato /ml fase líquida·h con fines comparativos con respecto a la actividad metanogénica.

4.7. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD METANOGENICA DE LAS PARTICULAS PLASTICAS DE POLIETILENO

La finalidad de esta prueba es evaluar la capacidad de la biopelícula inmovilizada en las partículas plasticas de degradar acetato y transformarlo en metano. El diseño de esta prueba es similar al de la actividad acidotrófica (ver

sección 4.6). De cada replica se toman muestras de la fase gaseosa cada 4 horas.

4.7.1. TOMA DE MUESTRAS GASEOSAS

De cada replica se toma 0.1 ml con jeringa insulínica desechable, purgada previamente y evitando humedecerla con la fase líquida y se inyecta directamente al cromatógrafo de gases GOW MAC para la determinación de CO₂ y CH₄

4.7.2. ANALISIS DE MUESTRAS GASEOSAS

Las muestras gaseosas se analizaron en un cromatógrafo de gases GOW MAC serie 550 con detector de conductividad térmica, y una columna de acero inoxidable empacada con Carbosphere 80/100 a las siguientes condiciones: temperatura del inyector 170 °C, temperatura del detector 190 °C, temperatura de la columna 140 °C, flujo de helio 30 ml/min y volumen de inyección 0.1 ml.

La actividad metanogénica específica se reporta por medio del siguiente cálculo:

$$\frac{\mu\text{mol CH}_4}{\text{ml. fase gas} \cdot \text{h}} \times \frac{1.4 \text{ fase gas}}{\text{ml fase líquida}} \times \frac{5 \text{ ml spte. en f.l.}}{\text{g. spte. seco}} \times \frac{\text{g. spte. seco}}{\mu\text{g. proteína}} = \frac{\mu\text{mol CH}_4}{\mu\text{g. proteína} \cdot \text{h}}$$

ó

$$\frac{\mu\text{mol CH}_4}{\text{ml fase gas} \cdot \text{h}} \times \frac{1.4 \text{ ml fase gas}}{\text{ml fase líquida}} \times \frac{5 \text{ ml spte. en f.l.}}{\text{g. spte. seco}} \times \frac{\text{g. spte. seco}}{\text{mg SSV}} = \frac{\mu\text{mol CH}_4}{\text{mg SSV} \cdot \text{h}}$$

En donde $\mu\text{mol CH}_4/\text{ml fase gas} \cdot \text{h}$ es la pendiente de la máxima producción de metano de la curva metanogénica.

4.8. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD METANOGENICA DEL LODO

Se sigue el mismo procedimiento empleado en la actividad metanogénica de las partículas descrito en la sección anterior, solo que en este caso en las botellas serológicas se colocan 5 ml de lodo.

4.9. CURVA ESTANDAR DE METANO

La curva estándar de metano se lleva a cabo de la siguiente manera: Se preparan 10 botellas serológicas con un volumen de 58.37 ml, a las que se les adiciona 25 ml de agua destilada. Posteriormente se les inyectan 2, 4, 6, 8, y 10 ml de metano por duplicado. El metano se toma directamente del tanque con una jeringa desechable de 10 ml a una presión de 1 kg/cm².

Posteriormente de cada botella se toman muestras gaseosas en forma similar a como se hace en 4.7.1 Se registran las áreas y se calcula la concentración de metano presente en la fase gaseosa de las botellas con el siguiente cálculo: 1 mol de CH₄ a 580 mm Hg y 20 °C corresponde a 31630 ml de CH₄, entonces:

$$\frac{1 \text{ ml } CH_4}{35 \text{ ml fase gas}} \times \frac{1 \text{ mol } CH_4}{31630 \text{ ml } CH_4} \times \frac{1 \times 10^6 \text{ } \mu\text{mol}}{1 \text{ mol}} = 0.9033 \frac{\mu\text{mol } CH_4}{\text{ml fase gas}}$$

Ó

$$\frac{0.0011 \text{ } CH_4}{0.0351 \text{ fase gas}} \times \frac{1 \text{ mol } CH_4}{31.630 \text{ l } CH_4} \times \frac{1 \times 10^6 \text{ mmol}}{\text{mol}} = 0.9033 \frac{\text{mmol } CH_4}{\text{l fase gas}}$$

Con las áreas y las concentraciones se elabora una regresión lineal para obtener los coeficientes de la recta y la correlación. Esta curva estándar permite interpretar las áreas registradas de las muestras problema y construir las curvas de actividad. (Ver figura 8.1 en el anexo)

4.10. DETERMINACION DE PROTEINA SOLUBLE

Una forma de evaluar cuantitativamente la cantidad de biopelícula formada en las partículas plásticas de polietileno es a través de la determinación de la cantidad de proteína soluble con azul de Coomassie G-250 (Sedmak et al., 1976). Este análisis depende de la conversión del colorante azul intenso que adquiere cuando la muestra de proteína se acopla a este reactivo, y cambia el pH de la solución. Las ventajas de este procedimiento radican en que se pueden determinar una gran cantidad de proteínas y polipéptidos con peso molecular mayor a 3000. La absorbancia puede ser determinada casi inmediatamente a 620 nm, el color del colorante es estable de 60 a 90 minutos a temperatura ambiente. Es un análisis sumamente sensible ya que permite detectar cantidades menores a 1.0 µg de proteína comparado con 5-10 µg del análisis de Lowry.

La prueba se efectúa de la siguiente manera:

1. Se prepara el colorante azul de Coomassie G-250 al 0.06% y se disuelve en ácido perclórico al 3%, posteriormente se filtra la solución en papel filtro Whatman No. 1.
2. Se prepara el buffer de fosfatos, el cual consta de dos soluciones: La solución A se prepara disolviendo 13.6 g de KH_2PO_4 en 1 litro de agua destilada, en la solución B se colocan 26.8 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, posteriormente se colocan 85 ml de la solución A y 165 ml de la sol B a fin de tener una solución buffer de fosfatos de pH 7.
3. Se prepara una solución estándar de proteína con seroalbúmina bovina a una concentración de 100 µg/2ml y se disuelve en una solución salina de NaCl 0.15 M.
4. Se construye la curva estándar de acuerdo a los datos contenidos en la tabla 4.10 (ver figura 8.2 en el anexo).

5. Dos minutos antes de ser leídos los tubos de la curva estándar, se les adicionan 2 ml del reactivo azul de Coomassie G-250
6. Se agitan los tubos y se leen a 620 nm antes de una hora.

T A B L A 4.10.
CURVA ESTANDAR DE PROTEINA CON AZUL DE COOMASSIE

TUBO	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ml. de sol. std. de pro teína (100 µg/2 ml)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2	1.4	1.6	1.8	2.0
sol. buffer de fosfatos	2	1.8	1.6	1.4	1.2	1.0	0.8	0.6	0.4	0.2	0.0
concentración (µg/2 ml)	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100

7. Preparación de muestras: colocar en un tubo de ensaye 1 ml de partículas plásticas de polietileno, a las que se les agregan 4 ml de solución buffer de fosfatos. A fin de que se desprenda la biopelícula de las partículas se sonica el tubo durante 10 minutos, con ayuda de un sonicador. Posteriormente con una jeringa se extrae el líquido del tubo y se deposita en una celda para espectrofotómetro y se le agrega 4 ml del reactivo azul de Coomassie G-250, dos minutos antes de que la muestra sea leída en el espectrofotómetro.
8. A las partículas plásticas de polietileno que quedaron en el tubo de ensayo se les repite el proceso tal como se describe en el punto anterior, hasta que las lecturas son cercanas a cero.
9. Por medio de la curva estándar preparada previamente se obtiene la concentración de proteína detectada y la suma de las lecturas de estos "lavados" será el contenido total de proteína soluble en las partículas.
10. Por último se relaciona la concentración de proteína con la cantidad de plásticos usados. Después del último lavado, el tubo de ensaye se destapa y se

pone a secar a 60 °C durante 24 horas. Posterior a este tiempo se pesan cuidadosamente los plásticos y esta cantidad se relaciona con la concentración de proteína para expresarlo en μg de proteína soluble/gramo de soporte seco.

$$273 \frac{\text{mg plast. seco}}{\text{ml plast. seco}} \times 0.36 \text{ plast. seco} = 98.28 \text{ mg plast. seco}$$

$$\frac{X}{98.28 \text{ plast. seco}} = \frac{\mu\text{g proteina}}{\text{mg plast. seco}} \times \frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ d}}$$

donde $X = \mu\text{g/ml proteina}$

4.11. DETERMINACION DE PARAMETROS CINETICOS

Esta prueba se realiza con la finalidad de conocer los valores de K_s (Constante de saturación ó constante de afinidad del sustrato), así como la $V_{\text{máx}}$ (velocidad máxima de degradación del sustrato), según la ecuación de Michaelis-Menten.

$$\frac{v}{V_{\text{máx}}} = \frac{[S]}{K_s + [S]}$$

El experimento se realiza en botellas serológicas tal como se describe en 4.6. En esta prueba se emplea como sustrato acetato en las concentraciones: 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, mM y un grupo control que no contiene acetato. De acuerdo a la cantidad de acetato los grupos se leen a diferentes tiempos. Para las concentraciones 1 y 2 mM se tomaban muestras cada dos horas, en las concentraciones 3 y 4 mM las muestras se tomaron cada 3 horas. En la concentración 5 mM las muestras se tomaron cada 4 horas, por último en las concentraciones 10 y 15 mM las muestras se tomaron cada 12 horas.

Las cinéticas para 1, 2, 3 duraron 12 horas; para 4, 5 duraron 24 y para 10 y 15 duraron 48 horas.

Para la toma y análisis de muestras se sigue la misma metodología descrita en la sección 4.6.1 y 4.6.2 respectivamente.

4.12. MUESTRAS PARA MICROSCOPIA ELECTRONICA

Se tomaron del reactor partículas de polietileno, sin película y con película formada a fin de ser observadas en microscopia electrónica de barrido, se tomaron muestras a los siguientes tiempos: 90-120 días.

Las muestras se preparan de acuerdo a la metodología similar a la de por Zellner y col (1994). Inicialmente se lavan las partículas en amortiguador de cacodilato (Grado 1, Sigma Chemicals) 0.1 M a pH 7.5 y se fijan en glutaraldehído (Grado 1, solución al 25 %, Sigma Chemicals) al 3% durante periodos de 12 a 24 horas, a la solución amortiguador. Después de fijar las muestras se lavan con el amortiguador dos veces por 10 minutos y se deshidratan con baños sucesivos en soluciones de etanol (Baker, 99% de pureza) al 10, 20, 40, 60, 80, 95 y 100%. Cada baño dura 10 minutos y se hacen dos de ellos en cada concentración.

La fijación y deshidratación con etanol se hizo en ampollitas o tubos de vidrio templado de 1 cm. de diámetro por 7 cm. de longitud a los que previamente se les hace un estrangulamiento para facilitar el sellado.

Después se remueve totalmente el etanol y se congela la muestra a $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$, al sumergir las ampollitas en nitrógeno líquido. Posteriormente las muestras dentro de las ampollitas son deshidratadas por liofilización a $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ y a un vacío de 7 micrones de Hg en un liofilizador Labconco Lyph-Lock 4.5 durante 3 a 5 horas. Al termino de este tiempo, las ampollitas se sellan al vacío. Por último se extraen las partículas de las ampollitas, se colocan en el portamuestras y se recubren con aluminio, carbón u oro con un Sputter-Coater

Bal-Tec SCD 050. Y se observaron en el microscopio Jeol JSM-5200 y en el microscopio Zeiss DSM 940 A.

5. RESULTADOS

5.1. DINAMICA DE INMOVILIZACION DE LAS PARTICULAS PLASTICAS DE POLIETILENO

5.1.1. ACTIVIDAD ACIDOTROFICA

Este experimento permite medir la velocidad a la que se forma biopelícula en las partículas de polietileno, el parámetro que proporciona dicha información es la velocidad de degradación del acetato. También la desaparición de dicho ácido se relaciona con la formación de metano.

La mezcla de partículas plásticas de polietileno permaneció en el reactor 135 días, durante este tiempo se les hicieron un total de 6 mediciones acetotróficas, en los siguientes tiempos: 15, 30, 45, 70, 100 y 135 días. La figura 5.1.1. muestra la forma en que la flora microbiana utiliza el acetato en los diferentes tiempos durante un lapso de 135 días.

La primera actividad se mide después de 15 días de haberse arrancado el reactor, se puede ver que la degradación del acetato es muy lenta, con una actividad máxima de $0.000516 \mu\text{mol acetato}/\mu\text{g proteina/h.}^{(2*)}$

En la segunda actividad a los 30 días, durante las primeras veinte horas la degradación de acetato es muy lenta, pero a partir de este momento y hasta las 45 horas se produce la degradación rápida del acetato, quedando una cantidad mínima que se agota totalmente hacia las 70 horas. En este caso se obtiene una velocidad de degradación de $0.00142 \mu\text{mol acetato}/\mu\text{g proteina/h.}$ que es un valor mayor que el obtenido en la cinética anterior. Estos datos demuestran la formación incipiente de una biopelícula, y en base a la prueba de DQO realizada se determina que dicha biopelícula mas el inóculo adicionado en esta etapa agotan el 40% de la carga orgánica presente en el medio.

^{2*} El valor se obtiene de acuerdo a las indicaciones de la sección 4.6., 4.6.1y 4.6.2.

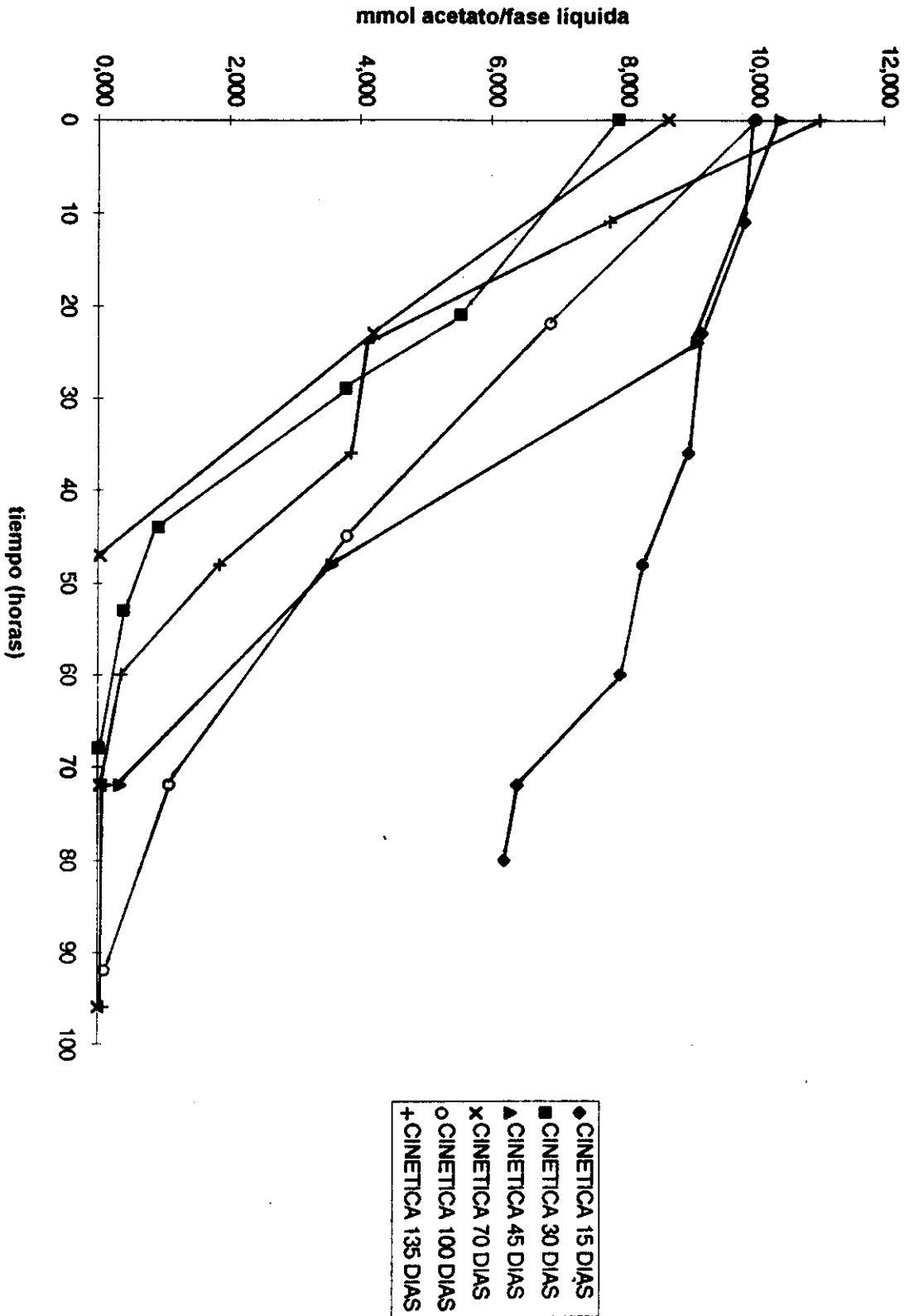


Figura 5.1.1 Actividad acetoclastica de las biopelículas en el reactor de lecho fluidificado invertido en mesofilia

La tercera actividad a los 45 días al principio muestra un ligero retraso en el consumo de acetato, para después producirse la rápida degradación del mismo. En este caso se obtiene una velocidad de 0.001325 $\mu\text{mol acetato}/\mu\text{g proteína/h}$, valor ligeramente menor al obtenido en la cinética anterior.

TABLA 5.1.1. Actividad acetoclas tíca de las biopelículas inmovili- zadas en polietileno molido en función del tiempo.	
TIEMPO (Días)	<math>\mu\text{mol acetato}/\mu\text{g pro- teína/h}</math>
15	0.000516
30	0.001420
45	0.001325
70	0.001660
100	0.000976
135	0.001293

NOTA: Las actividades específicas se calcularon de acuerdo a la metodología 4.6.2

En la cuarta actividad a los 70 días ya hay un cambio significativo en el comportamiento de la flora bacteriana inmovilizada ya que tan pronto se agrega acetato, este es degradado inmediatamente de tal manera que a las 48 horas se agota totalmente en este caso se obtiene una velocidad de degradación de 0.00166 $\mu\text{mol acetato}/\mu\text{g proteína/h}$ que es la más alta encontrada.

En la quinta actividad a los 100 días el acetato es degradado tan pronto se inicia la cinética aunque mas lentamente que en la cinética anterior, ya que se agota la mayor cantidad hacia las 72 horas y el residuo que queda se agota hasta las 92 horas. En este caso se obtiene una velocidad de 0.000976 $\mu\text{mol acetato}/\mu\text{g proteína/h}$, valor inferior comparado con el obtenido en la cinética anterior. En este caso el decremento obtenido puede deberse a una etapa de desestabilización producida en el reactor, se tuvo una falla en la operacion

del equipo que produjo la pérdida de la fase líquida y pérdida de biopelícula por lo que se produce la muerte de un importante número de poblaciones de microorganismos.

En la sexta actividad a los 135 días y debido a que el reactor vuelve a estabilizarse la velocidad se incrementa nuevamente hasta alcanzarse el valor de $0.001293 \mu\text{mol acetato}/\mu\text{g proteína/h}$, lo que demuestra que la flora bacteriana adherida a las partículas de polietileno se esta incrementando nuevamente y tiene la tendencia a alcanzar la densidad lograda hacia los 70 días, por lo que hay una tendencia a alcanzar nuevamente la actividad máxima de $0.00166 \mu\text{mol acetato}/\mu\text{g proteína/h}$, similar a la obtenida en la cuarta actividad.

La figura 5.1.2 muestra las variaciones en la actividad acetotrófica de la flora microbiológica inmovilizada en las partículas de polietileno a lo largo de 135 días, tiempo que dura el experimento.

Se obtiene una curva de tipo exponencial, donde se observan dos fases: la primera de crecimiento abarca del tiempo cero y hasta los 45 días. Una segunda fase de estado continuo que va de los 45 días y hasta el termino del experimento 135 días. Inicialmente el desarrollo de la biopelícula se da en forma inestable y alcanza su máxima actividad acetotrófica hacia los 70 días. Los valores de actividad a los 70 y 135 días (respectivamente son: $0.00166 \mu\text{mol acetato}/\mu\text{g proteína/h}$ y $0.001293 \mu\text{mol acetato}/\mu\text{g proteína/h}$) debido a que son valores cercanamente similares muestran que se esta estabilizando la actividad acetotrófica de la biopelícula inmovilizada. El decremento de actividad observado a los 100 días obedece a una etapa de desestabilización del reactor discutido en párrafos anteriores. (González y col. 1992).

Los resultados de este experimento demuestran que a los 70 días de haberse arrancado el reactor, en las partículas de polietileno se logra la má-

xima inmovilización de biopelícula, formada por microorganismos acetotróficos demostrado por el valor de la actividad específica que en este tiempo alcanza su valor más alto.

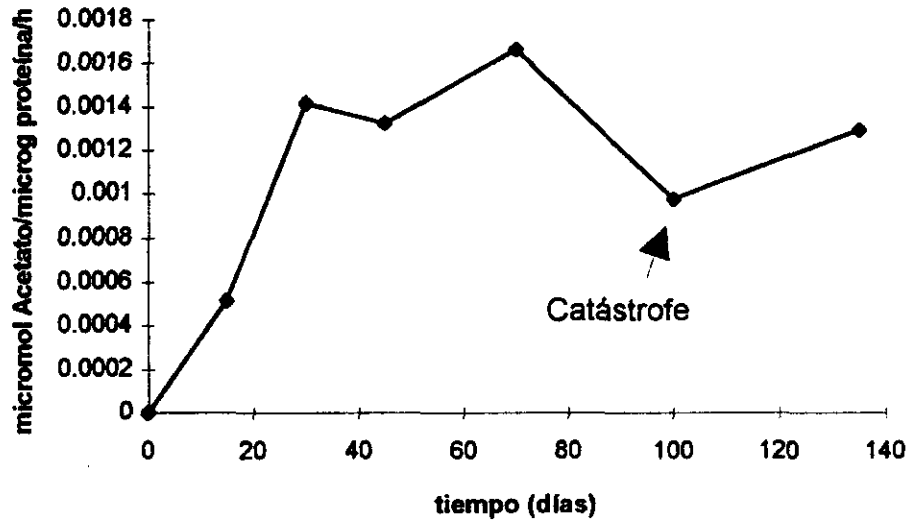


FIG. 5.1.2 Dinámica de inmovilización donde se observa la evolución durante el tiempo de inmovilización en la actividad acetoclástica.

Los datos de las cinéticas demuestran que en forma inestable las biopelículas se desarrollan sobre las partículas de acuerdo a la teoría del consorcio estructural propuesta por (Guiot y et al. 1991). Debido a que la actividad acetotrófica va en constante aumento en forma paralela a como se incrementa el grosor de la biopelícula. La actividad acetoclástica se incrementa debido a la inmovilización de la microflora acetotrófica en los espacios internos de la biopelícula por lo que al final del experimento se estabiliza

En el estudio de González, (1990) la dinámica de la biopelícula inmovilizada en polietileno molido es diferente, se indica que a los 30 días la microflora acetoclástica tiene un crecimiento inestable comparada con la flora acidoclastica, pero a partir de este momento se da una mayor inmovilización de la flora acetoclástica y presenta un crecimiento gradual y estable hacia los 70 y

101 días alcanzando su máxima actividad de 0.02637 $\mu\text{moles acetato/h}\cdot\text{mgSST}$ en el último tiempo ver tabla 5.1.2.

TABLA 5.1.2. Comparación de actividades acetoclásticas de biopelículas formadas en polietileno molido.		
	González (1990)	En este estudio
Días	$\mu\text{mol. acet/h}\cdot\text{mgSST}$	$\mu\text{mol. acet}/\mu\text{g prot/h}$
30	0.00850	0.001420
70	0.02446	0.001660
100	0.02637	0.000976
135		0.001293

5.2. ACTIVIDAD METANOGENICA DE LAS PARTICULAS DE POLIETILENO.

Esta determinación se realizó al final del experimento (135 días) y se obtuvo una producción de metano de 0.00375 $\mu\text{mol CH}_4/\mu\text{g proteína/h}$ por lo que con esta determinación se reitera nuevamente la presencia de flora metanogénica capaz de transformar el acetato y los productos de la degradación del mismo (H_2 y CO_2) en metano. (Ver figura 5.2)

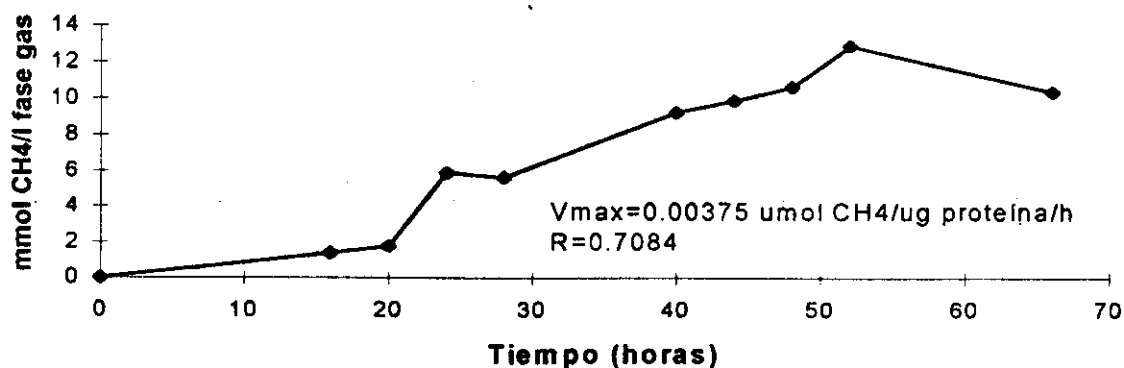


Figura. 5.2. Metanogénesis de partículas mesofílicas a los 135 días de inmovilización

El valor obtenido es menor, comparado con los valores obtenidos por otros autores. Ver tabla 5.2. (Gorris, 1988 y González, 1990) logran actividades metanogénicas sensiblemente superiores a la alcanzada en el presente estudio. (Verrier y col. 1988) obtiene una actividad ligeramente superior al valor obtenido en el presente estudio. Por lo tanto la flora metanogénica inmovilizada en el presente estudio es poco activa comparada con la actividad de las biopelículas que logran obtener los autores antes citados.

TABLA 5.2. Comparación de las actividades metanogénicas de biopelículas formadas en polietileno por diferentes autores		
Autor	Soporte	$\mu\text{mol CH}_4/\mu\text{g prot}\cdot\text{h}$
Verrier y col. (1988)	placa	0.00765 (*)
Gorris (1988)	placa	58.80
	molido	72.45
González (1990)	placa	58.80
	molido	72.460
En este estudio	molido	0.00375

* Este valor lo obtiene en dos horas

5.3. DETERMINACION DE PROTEINA

Se determinó la máxima cantidad de proteína alcanzada al término del experimento y se obtiene un valor de 375.45 μg proteína/g soporte seco, lo que permite conocer la cantidad de biopelícula formada al término del experimento sobre las partículas de polietileno. El valor se obtiene siguiendo las indicaciones de la sección 4.10 y los cálculos aparecen en el anexo ver 8.2.

5.4. DETERMINACION DE PARAMETROS CINETICOS.

A los 35 días de iniciado el experimento se hizo la determinación de parámetros cinéticos. La figura. 5.4.1. muestra las cinéticas obtenidas para cada concentración. Para la cinética de la concentración 1 mM se produce la degradación total del acetato en 8 horas. En cambio en la concentración 2 mM solo se da una degradación parcial durante las primeras 12 horas y se degrada totalmente el acetato hacia las 24 horas.

Las cinéticas de las concentraciones 3 y 4 mM se degrada la mayor parte del acetato hacia las 25 horas. En el caso de 5 mm de acetato se degrada totalmente hacia las 37 horas.

En la concentración 10 mM, el acetato se degrada en un 80%, aproximadamente en 48 horas, y para la concentración 15 mM solo se degrada la tercera parte en el mismo tiempo.

TABLA 5.4. Actividades acetoclasticas a diferentes concentraciones, de las biopelículas inmovilizadas a los 35 días.	
Acetato mM	V. esp. $\mu\text{mol acetato}/\mu\text{g proteina/h}$
1	0.000825
2	0.001023
3	0.00095
4	0.00112
5	0.00133
10	0.00146
15	0.00138

Para la concentración de 1 mM se obtiene una actividad específica de 0.000825 $\mu\text{mol acetato}/\mu\text{g proteina/h}$ y a partir de este valor, en forma gradual la actividad específica, va aumentando conforme aumenta la concentración de acetato, obteniéndose la máxima actividad específica, de 0.00146 $\mu\text{mol acetato}/\mu\text{g proteina/h}$ para la concentración de 10 mM (ver tabla. 5.4).

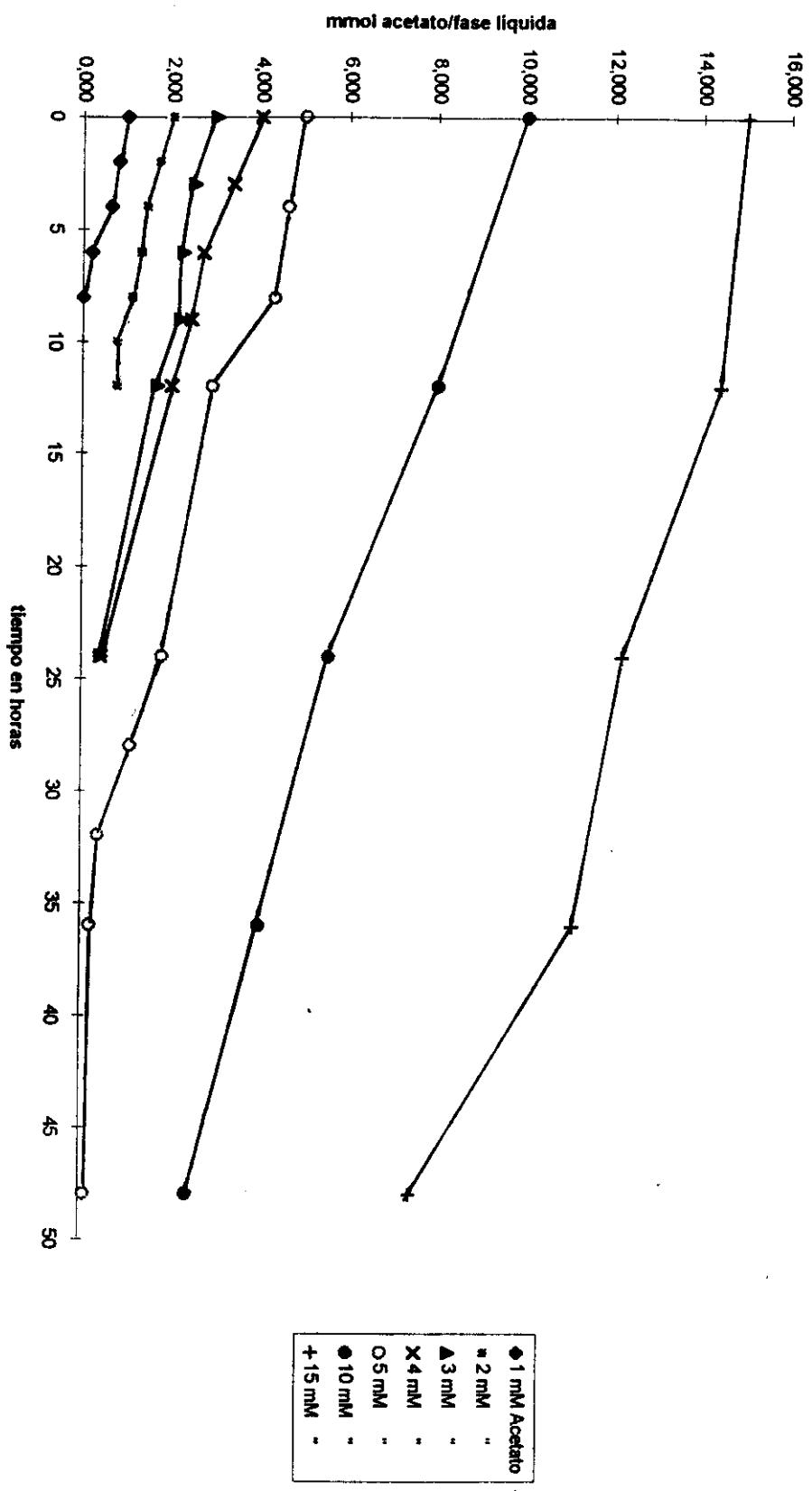


Figura 5.4.1. Cinéticas de degradación de acetato a diferentes concentraciones

La figura 5.4.2. muestra las actividades específicas obtenidas para cada cinética. Se observa la formación de una curva sigmoide, por lo que el comportamiento de la biopelícula adherida a las partículas de polietileno, es explicado a través del modelo de Michaelis-Menten.

Por lo que con la finalidad de conocer K_s (constante de disociación del complejo enzima-sustrato) y $V_{m\acute{a}x}$ (velocidad inicial máxima de degradación del sustrato) se lineariza la ecuación de Michaelis-Menten de acuerdo a las propuestas hechas por los siguientes autores: a) Lineaweaver-Burke b) Hanes-Woolf c) Woolf-Augustinsson-Hoffstee d) Eadie-Scatchard (Segel, 1992).

Las figuras.5.4.3.; 5.4.4.; 5.4.5. y 5.4.6. muestran estos modelos de donde se observa que de los diferentes modelos, la $V_{m\acute{a}x}$. de $0.00151 \mu\text{mol acetato}/\mu\text{g prote\acute{i}na/h}$ así como la K_s de 1.0671 mM , así mismo el coeficiente de correlación de 0.9860 , del modelo de Hanes-Woolf. Son los que mejor ajustan los datos cinéticos a una línea recta y por consiguiente es el que explica más satisfactoriamente el patrón de consumo de acetato de la biopelícula inmovilizada en las partículas plásticas.

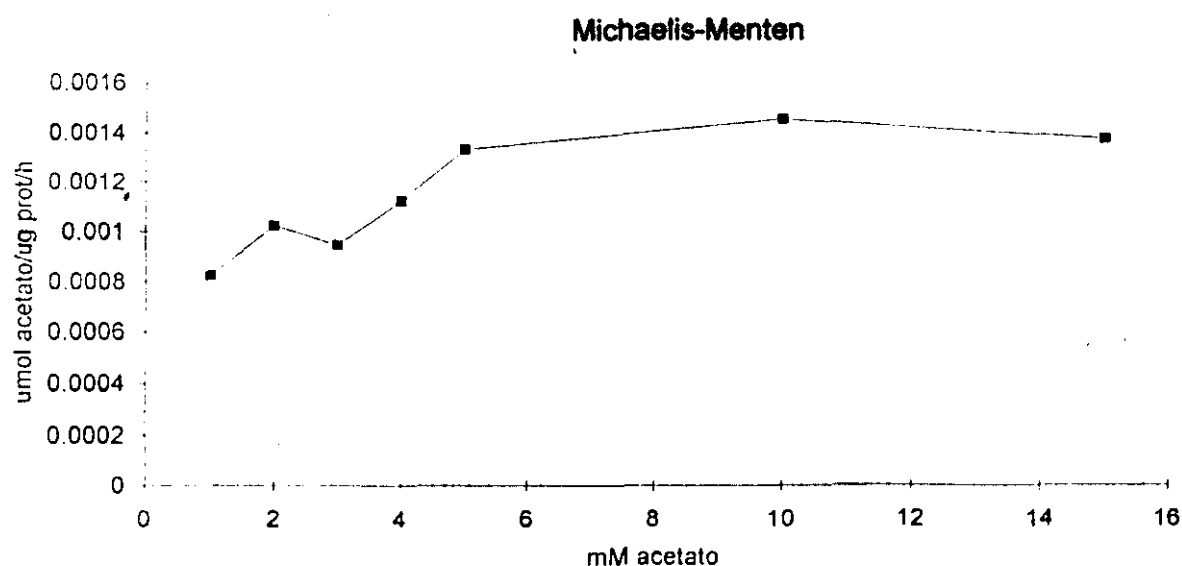


Figura 5.4.2. Velocidades específicas a diferentes concentraciones de sustrato

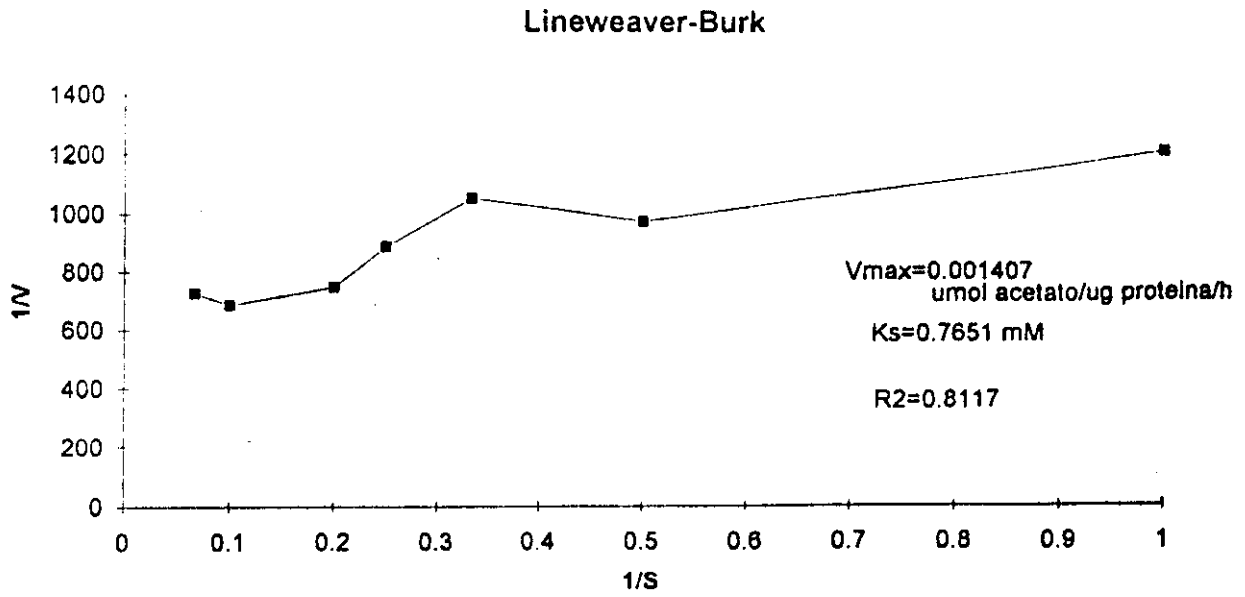


Figura 5.4.3. Modelo de Lineweaver-Burk

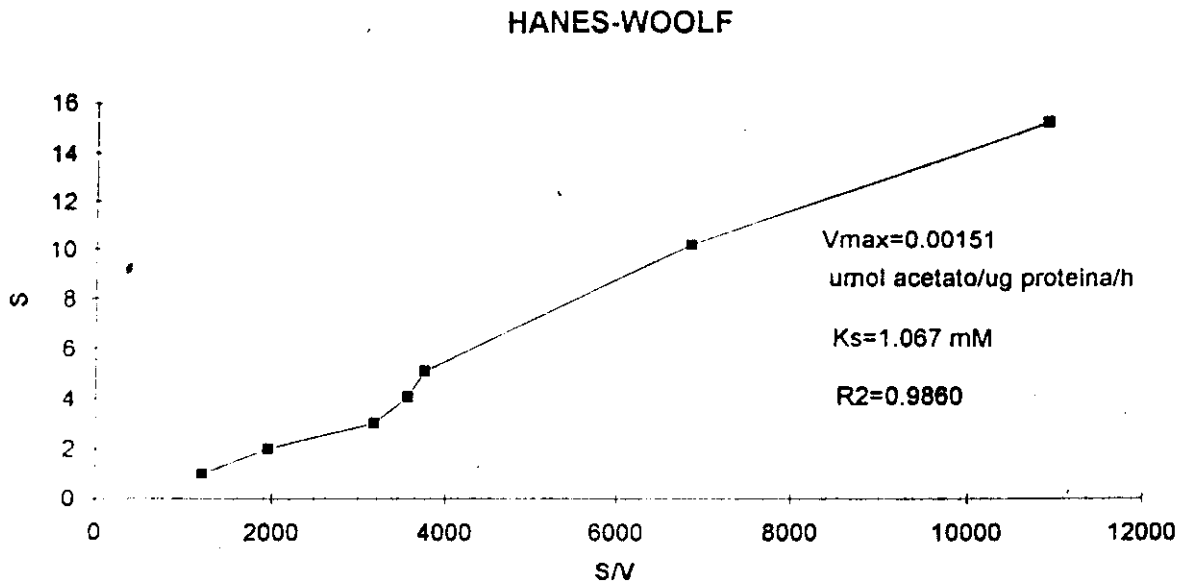


Figura 5.4.4. Modelo de Hanes-Woolf

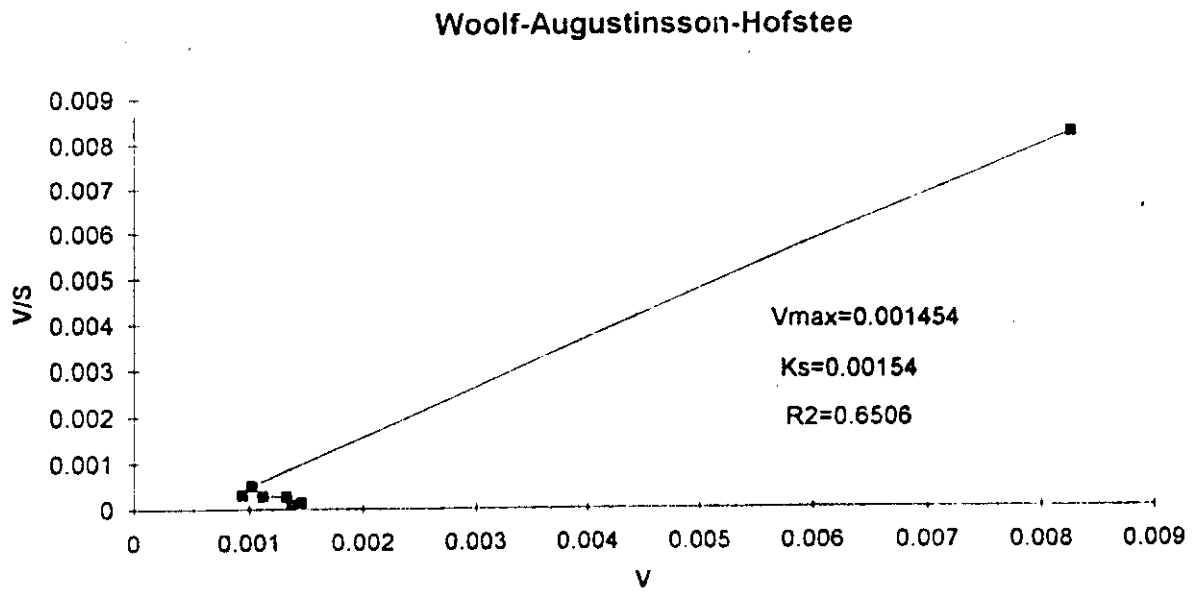


Figura 5.4.5. Modelo de Woolf-Augustinsson-Hofstee

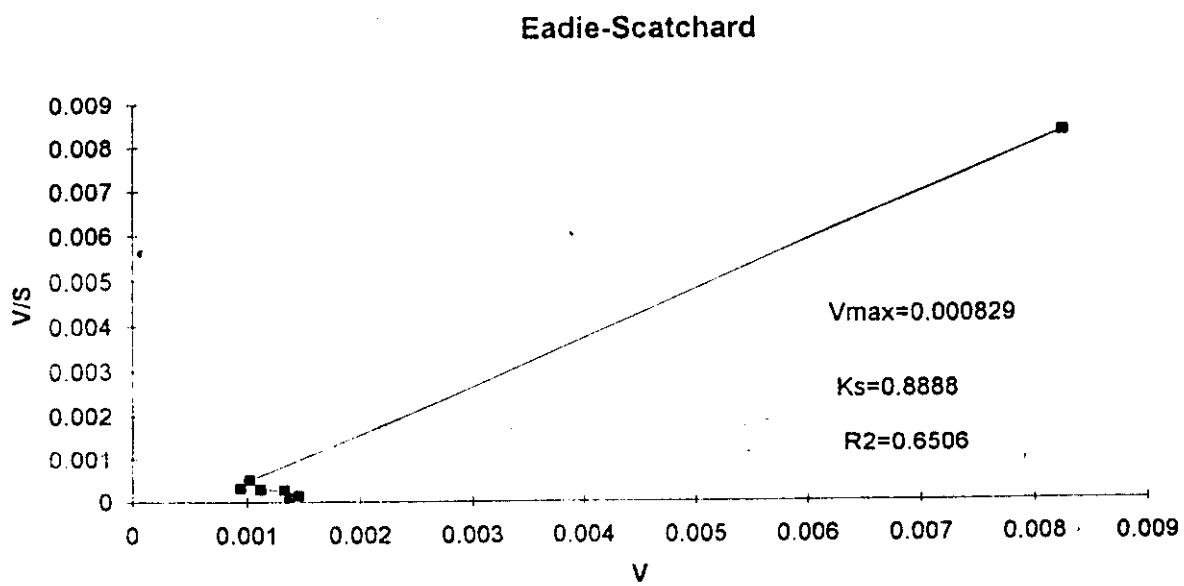


Figura 5.4.6 Modelo de Eadie-Scatchard

5.5. MICROSCOPIA ELECTRONICA

La microfotografía 5.5.1; 5.5.2 muestran partículas de polietileno sin colonizar en donde se puede apreciar que por el molido del polietileno se obtienen superficies tanto lisas como rugosas. Las rugosas son de especial importancia ya que favorecen la adhesión de la flora microbiana con la consiguiente formación de biopelícula.

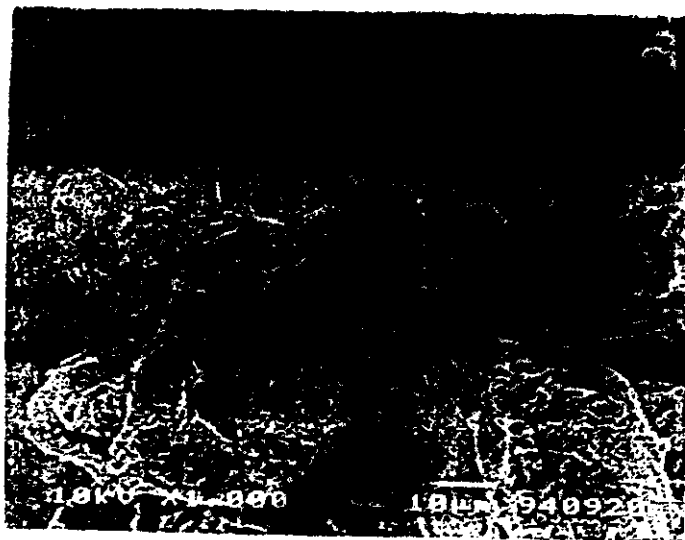
Las microfotografías 5.5.3; 5.5.4; 5.5.5; 5.5.6 fueron tomadas a partículas de plástico colonizadas y en ellas se pueden observar desde cadenas individuales o bien agrupamientos de ellas que guardan parecido con *Methanotherix sp.*, y también es posible observar cocos libres parecidas a *Methanosarcina sp* que son muy escasos, también es posible observar fragmentos de biopelícula. Debido a que durante el proceso de preparación las muestras se deshidratan, esto ocasiona la deformación y destrucción de las biopelículas (Zellner et al., 1994) por lo que no es fácil su observación a través de microscopia de barrido y por lo tanto en las microfotografías obtenidas sólo se observan fragmentos de la misma ver microfotografía 5.6.6.

5.6. DISCUSION

Las diferentes pruebas llevadas a lo largo del experimento como son la evolución de la actividad acidotrófica así como la actividad metanogénica obtenida al final del experimento y la cantidad de biopelícula cuantificada en términos de cantidad de proteína estos valores comparados con los obtenidos por (Verrier y col. 1988), (Gorris, 1988) y (González, 1990) demuestran que en el presente estudio se logra una escasa formación de biopelícula en las partículas de polietileno lo que puede deberse a toda una serie de factores que en conjunto inciden en las poblaciones de microorganismos, los que dificultan su crecimiento y adherencia a las partículas de polietileno. Entre estos se pueden citar: la utilización de una velocidad superficial de 9 m/h que en este caso es alta

y produce grandes esfuerzos cortantes que desprenden fácilmente la biopelícula. González, (1990) emplea una velocidad de flujo de 2 m/h y logra inmovilizar una mayor cantidad de biopelícula. Otros factores son: la cantidad y tipo de inóculo utilizado. Por otra parte se emplea un medio de cultivo con bajo contenido de minerales.

De igual manera las microfotografías en microscopía de barrido confirman los resultados anteriores ya que muestran escasa colonización de microflora acetoclástica en las partículas de polietileno. Sin embargo se observa que en estas colonias la especie predominante es *Methanothrix sp*, este predominio puede ser debido a que esta especie previamente se encontraba en el inóculo, además el reactor se alimento con una carga orgánica de 1 g acetato /litro de medio lo que también favorece su presencia. Por otra parte este grupo de bacterias tienen la posibilidad de formar filamentos largos de varios individuos lo que facilita la colonización de las superficies lisas y rugosas del polietileno tal como se observa en las microfotografías.



Microfotografía 5.5.1. de partículas de polietileno sin colonizar donde se observan rugosidades y cavidades formadas al momento de cortar el polietileno. Microfotografía tomada con el microscopio Joel JSM-5200



Microfotografía 5.5.2. mostrando rugosidades y superficies lisas sin colonizar, tomada con el microscopio Joel JSM-5200



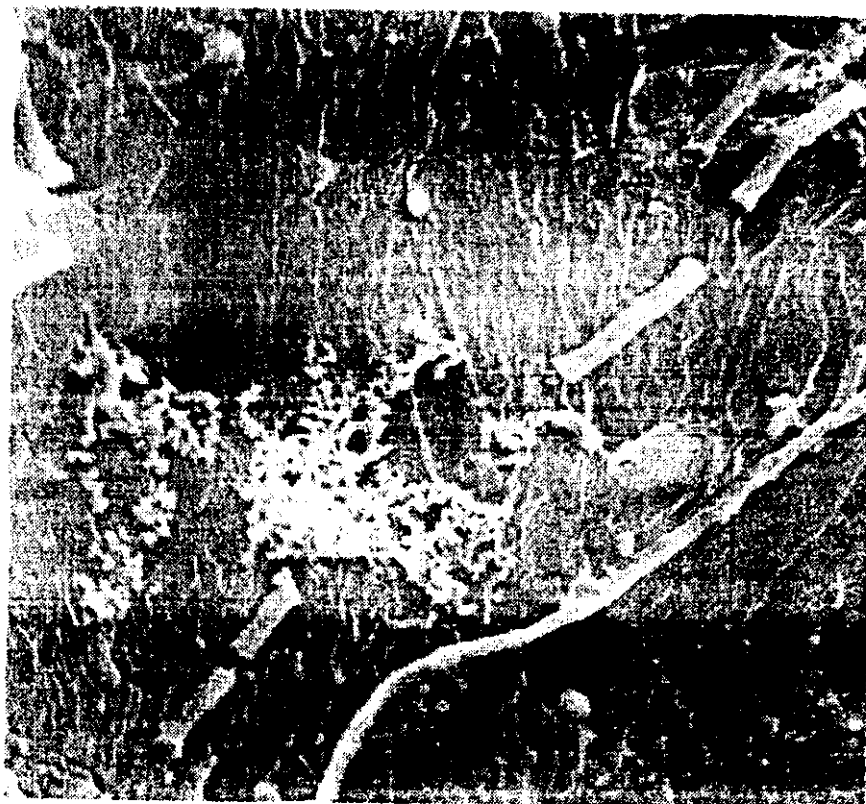
Microfotografía 5.5.3. donde se observa una área lisa y una cavidad. El área lisa esta colonizada por *Methanotrrix sp.* (cadenas alargadas) y por *Methanosarcina* (coccos). Microfotografía tomada con el microscopio Zeiss DMS 940 A.



Microfotografía
5.5.4. se observa
una cavidad coloni-
zada por cadenas
de *Methanotherix* sp.
Microfotografía to-
mada con el mi-
croscopio Zeiss
DMS 940 A.



Microfotografía
5.5.5. se observa un
área lisa altamente
colonizada por ca-
denas entreveradas
de *Methanotherix* sp.
Microfotografía to-
mada con el mi-
croscopio Zeiss
DMS 940 A.



Microfotografía 5.5.6. se observa un área lisa donde se encuentran restos de biopelícula y una cadena de *Methanotherrix*. Microfotografía tomada con el microscopio Zeiss DMS 940 A.

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos las partículas de polietileno representan un material idóneo para ser utilizado como soporte en reactores que retienen la biomasa. Debido a la baja densidad de este material y empleando lechos fluidizados invertidos se requieren bajas tasas de recirculación para fluidizar dicho material a lo largo del reactor.

A través de seis actividades acetoclasticas se hace un seguimiento de las biopelículas inmovilizadas en las partículas de polietileno durante 135 días. A los 70 días se logra la máxima actividad acetoclástica de $0.001660 \mu\text{mol acetato}/\mu\text{g proteína/h}$. la que resulta ser menor a la obtenida por González (1990) a los 101 días. $0.02637 \mu\text{moles acetato/h}\cdot\text{mgSST}$. A los 100 días el reactor sufre una desestabilización, que afecta a la flora microbiana adherida lo que ocasiona que decaiga la actividad de la biopelícula. Posteriormente al estabilizarse el reactor se incrementa nuevamente la actividad acetoclástica de la flora microbiana con una tendencia a alcanzar la actividad que presentaba a los 70 días.

Al final se logra fijar una biomasa de $375.45 \mu\text{g proteína/g soporte seco}$ formada por microorganismos acetoclásticos, con una actividad metanogénica de $0.00375 \mu\text{mol CH}_4 \text{ proteína}\cdot\text{h}$ que resulta ser menor a la lograda por Gorris (1988) y González (1990) ya que en polietileno molido logran actividades metanogénicas de $72.45 \mu\text{mol CH}_4 \text{ proteína}\cdot\text{h}$ y $72.46 \mu\text{mol CH}_4 \text{ proteína}\cdot\text{h}$ respectivamente.

A los 35 días se hicieron cinéticas degradatorias de acetato a diferentes concentraciones con el fin de conocer la K_s y $V_{\text{máx}}$ de la biopelícula en formación. Al linearizarse la ecuación de Michaelis-Menten se encontró que el modelo de Hanes-Woolf fue el que mejor ajusto los datos a una línea recta con una K_s de 1.067 mM , $V_{\text{máx}}$ de $0.00151 \mu\text{mol acetato}/\mu\text{g proteína/h}$ y R de

0.9860 por lo tanto fue el que mejor explicó el patrón de consumo de acetato por parte de la biopelícula.

Las microfotografías electrónicas fueron de gran importancia ya que permitieron observar zonas colonizadas por bacterias en forma de cadenas lineales o entreveradas como es el caso de *Methanotherix sp.* La que además fue la especie predominante. Y se observaron bacterias aisladas en forma de cocos parecidas a *Methanosarcina. sp.* También se pudieron observar residuos de biopelícula, debido a que durante el proceso de deshidratación de las muestras las estructuras de las biopelículas se alteran y destruyen por lo que no es fácil observarlas.

Por lo tanto las pruebas de actividad acetoclastica específica y actividad metanogénica demuestran una escasa inmovilización de microflora acetoclastica lo que queda corroborado a través de las microfotografías obtenidas.

Por lo tanto en el presente estudio se cumplen los objetivos planteados ya que se logra la colonización de las partículas de polietileno, sin embargo es necesario profundizar mas ampliamente en estudios colaterales como son tipos de inóculos, adaptación de las biopartículas a diferentes tipos de aguas residuales, probar otros tipos de soportes, a fin de que un sistema de este tipo pueda ser implantado en forma satisfactoria.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Costerton, J.W. y Irvin R.T. (1981) The bacterial glyocalix nature and disease. *Ann. Rev. Microbiol.* 35:299-324
2. García, J.L., (1983) La fermentation methanique. Raport ORSTOM.
3. González G. (1990) Formación de películas microbianas en un reactor anaerobio de lecho fluidizado. Tesis Licenciatura. Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala UNAM.
4. González G., Ramírez, F. y Monroy O. (1992) Development of biofilms in anaerobic reactors. *Biotechnology Letters.* 14 (2):149-154.
5. Gorris, L.G.M. (1989) Biofilm development in laboratory methanogenic fluidized bed reactors. *Biotechnology and Bioengineering.* 33:687-693.
6. Guiot et al. (1991) A structure model of the anaerobic granule consortium. Sixth Internacional Symposium on anaerobic Digestion Brazil. 1-10.
7. Guiot R. S. (1992) Bioimmobilization in anaerobic reactors. Bioprocesos Anaerobios para el Tratamiento de Efluentes Industriales. UAM/IMP/ORSTOM.
8. Guyot, J.P. (1992) Introducción a la microbiología de los digestores anaerobios Bioprocesos Anaerobios para el Tratamiento de Efluentes Industriales. UAM/IMP/ORSTOM.
9. Lema, J.M. (1993) Operación y Control de Digestores Anaerobios en "Ier Curso Internacional Sobre Tratamiento de Efluentes Por Digestión Anaerobia". Universidad Católica de Valparaíso, Santiago de Chile.
10. Lettinga, G., y col 1980 Use of upflow sludge blancket reactor concept for biological wastewater treatment especially for anaerobic treatment. *Biotechnol. Bioeng.*, 22 (4):699-734.
11. Macario, A.J.L., Visser, F.A., van Lier, J.B., and Conway de Macario, E. (1991) Topography of methanogenic subpopulations in a microbial consortium adapting to thermophilic conditions. *Journal of General Microbiology* 137:2179-2189.
12. Meier-Schneiders, M. y col (1993) The attachment of bacterial cells to surfaces under anaerobic conditions. *Applied Microbiology Biotechnology* 38:667-673
13. Meraz, M., Monroy, O., y Morales, A., (1993) Inmovilización de bacterias anaerobias en termofilia. *Bioteconología.*
14. Monroy Hermosillo O. (1993) Bases microbiológicas y cinéticas de la digestión anaerobia en "Ier Curso Internacional Sobre Tratamiento de Efluentes Por Digestión Anaerobia". Universidad Católica de Valparaíso, Santiago de Chile.
15. Noyola, A. (1990) Tratamiento anaerobio de aguas residuales: una experiencia de adaptación de tecnología en México. Conferencia sobre tratamiento anaerobio de aguas residuales en América Latina. UNAM. PP. 337-357.
16. Ramirez Vives F. (1992) Degradación anaerobia de acetamida. Tesis maestria, Laboratorio de Microbiología Ambiental, Departamento de Bioteconología UAM-Iztapalapa.

17. Sedmak et al., (1976) Analisis para proteína con Coomassie, usando el azul brillante de Coomassie G-250 con ácido perclorico.
18. Segel, H.I. (1982) Cálculos de bioquímica Cómo resolver problemas matemáticos de bioquímica general. Edit Acribia. España.
19. Shapiro, M. and Switzenbaum, M.S. (1984) Initial anaerobic biofilms development. *Biotech. Letters* 6 (11):729-734.
20. Verrier D. y col. (1988) Adhesion of anaerobic bacteria to inert supports and development of methanogenic biofilms. Proceedings of the V International Symposium on Anaerobic Digestion. Pergamon Press. The Netherlands. 61-68.
21. Wolfe R.S. (1990) Novel coenzymes of archaebacteria. 41 Colloquim Mosbach 1990. The Molecular Basis of Bacterial Metabolism. pp 1-12. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
22. Zellner G. y col. (1994) Scanning electron microscopy of biofilms development in anaerobic fixed-bed reactors influence of the inoculum. *Biotech. Letters*. 16 (3): 315-320.

8. ANEXOS

8.1. CURVA ESTANDAR DE METANO

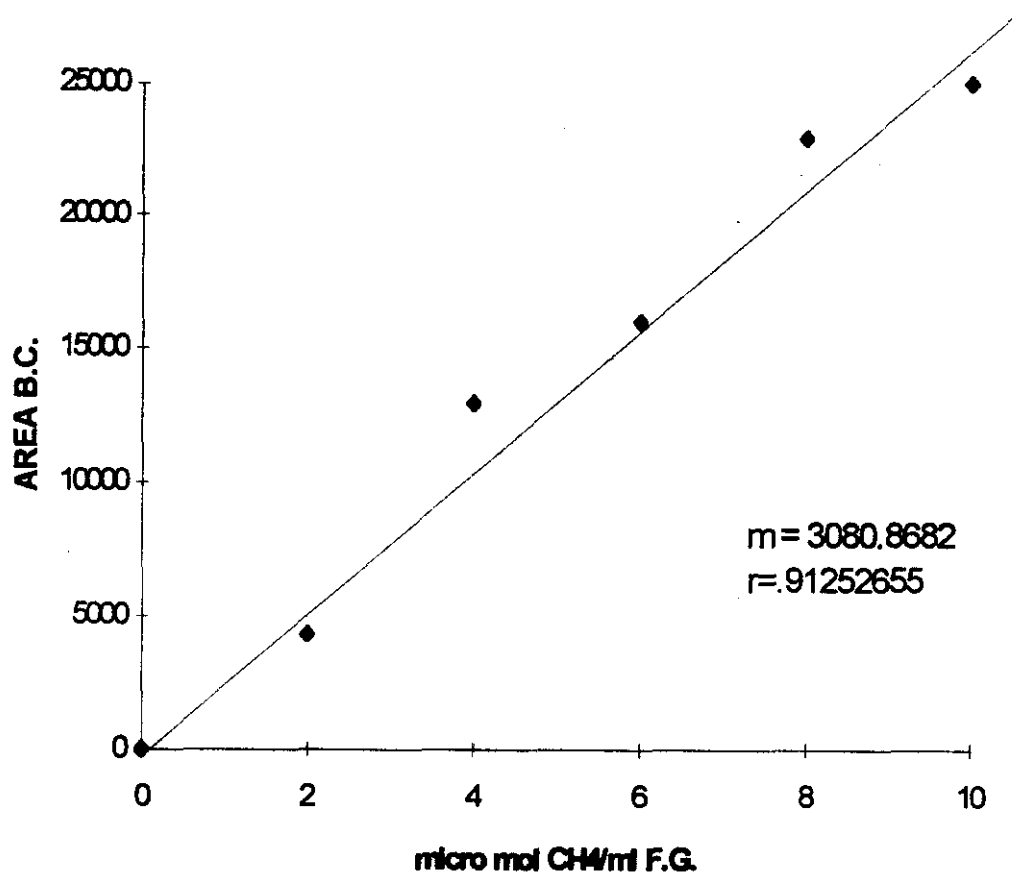


FIGURA 8.1 Curva estandard de metano

8.2. CURVA ESTANDAR DE PROTEINA

Calculo de proteína por gramo de soporte

1 ml de muestra húmeda-----0.36 ml de plástico seco
 -----0.64 ml de agua

Densidad del plastico = 273 mg plástico seco/ml de plástico seco

$V = 0.36$ ml de plástico seco y sustituyendo en la ecuación.

$$D \times V = M$$

$$273 \frac{\text{mg plast. seco}}{\text{ml plast. seco}} \times 0.36 \text{ ml plast. seco} = 98.28 \text{ mg plast. seco}$$

donde $X = 36.9 \mu\text{g}$ de proteína/ por ml plástico húmedo.

$M = 98.28 \text{ mg}$ plástico seco

Sustituyendo X y M en la ecuación

$$\frac{X}{M} = \frac{\mu\text{g proteína}}{\text{mg plástico seco}} \times \frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ d}}$$

$$\frac{36.9 \mu\text{g proteína/ml plástico húmedo}}{98.28 \text{ mg plástico seco}} = 0.375 \frac{\mu\text{g prot.}}{\text{mg plástico seco}} \times \frac{1000 \text{ mg}}{1}$$

$$= 375.45 \mu\text{g prot./g soporte seco}$$

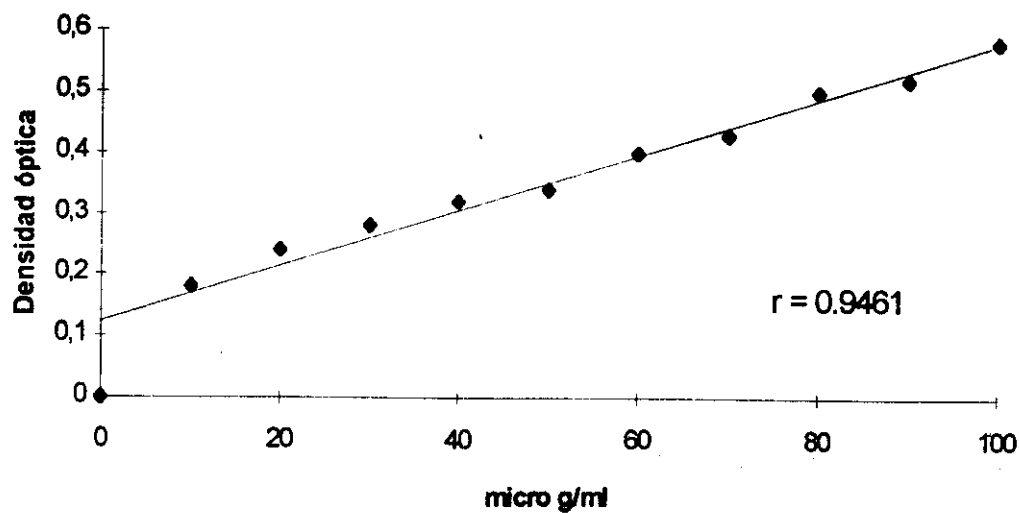


FIGURA. 8.2 Curva estándar de proteína

8.3. SOLUCIONES

SOLUCION MINERAL 1

Balch y col. (1979)

K_2HPO_4 _____	6	g/l
------------------	---	-----

SOLUCION MINERAL 2

Balch y col. (1979)

		g/l
KH_2PO_4 _____	6	6
$(NH_4)_2SO_4$ _____	6	6
NaCl_____	12	12
$MgSO_4, 7H_2O$ _____	2.6	2.6
$CaCl_2, 2H_2O$ _____	0.16	0.16

SOLUCION DE VITAMINAS

Balch y col. (1979)

		mg/l
Biotina_____	2	"
Acido Folico_____	2	"
Piridoxina HCl_____	10	"
Tiamina HCl_____	5	"
Riboflavina_____	5	"
Acido Nicotinico_____	5	"
DL. Pantotenato de Ca_____	5	"
Vitamina B 12_____	0.1	"
Acido p-Aminobenzoico_____	5	"
Acido Lipoico_____	5	"

Conservar a 4 °C y proteger de la luz

SOLUCION DE OLIGOELEMENTOS

Balch y col. (1979)

Disolver 1.5 gr. de ácido Nitrilotriacético con KOH hasta un pH de 6.5 después agregar los siguientes minerales:

	g/l
MgSO ₄ , 7H ₂ O _____	3.0
MnSO ₄ , 2H ₂ O _____	0.5
NaCl _____	1.0
FeSO ₄ , 7H ₂ O _____	0.1
CoSO ₄ o CoCl ₂ _____	0.1 "
CaCl ₂ , 2H ₂ O _____	0.1
ZnSO ₄ _____	0.1
CuSO ₄ , 5H ₂ O _____	0.01
AlK(SO ₄) ₂ _____	0.01
H ₃ BO ₃ _____	0.01
Na ₂ MoO ₄ , 2MoO ₄ , 2H ₂ O _____	0.01

Conservar a 4 °C

8.4. SUSTRATOS

ACETATO 10 mM*

1. Colocar 0.981 ml de ácido acético
2. Agregar 29.1 ml de agua reducida

vol total 30 ml

SOLUCION DE DISULFURO DE SODIO*

1. Tomar una cantidad de cristales de disulfuro de sodio y lavarlos con agua reducida, escurrir totalmente.
2. Ya limpios pesar 0.75 gr de cristales y disolverlos en 30 ml de agua reducida.

* El agua reducida se prepara hirviendo agua destilada bajo corriente de nitrógeno, se deja evaporar aproximadamente la quinta parte del volumen a utilizar, posteriormente se coloca en botellas serologicas la cantidad de agua reducida indicada en las formulas y se agrega la cantidad de ácido correspondiente, se anillan las botellas y se esterilizan durante 15 minutos a 121 °C, a 1 atm. de presión.