

TEMA

FUNDAMENTOS DE LOS PROCESOS MICROBIANOS: ESTEQUIOMETRÍA Y CINÉTICA

- 1.- INTRODUCCIÓN
- 2.- ESTEQUIOMETRÍA GENERAL DEL CRECIMIENTO MICROBIANO
- 3.- CONCEPTO DE PRODUCCIÓN EN LAS REACCIONES MICROBIANAS
- 4.- COMPOSICIÓN ELEMENTAL DE LA BIOMASA
- 5.- DEMANDA DE NUTRIENTES
- 6.- RELACIÓN ESTEQUIOMETRÍA – CINÉTICA DE REACCIONES
- 7.- FUNDAMENTOS CINÉTICOS

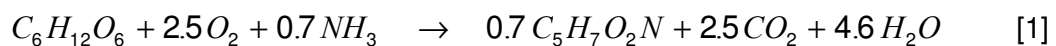
1.- INTRODUCCIÓN

La teoría básica que se presenta es de aplicación a los procesos biológicos en general, es decir, tanto a los de cultivo en suspensión como a los biopelícula. Cuando se estudia experimentalmente los aspectos cinéticos, y sobre todo estequiométricos, de un proceso biopelícula casi inevitablemente hay que recurrir a la resuspensión de la biomasa fijada al soporte para realizar la determinación de los coeficientes de interés práctico. Sin embargo, está ampliamente demostrado que esta alteración, la resuspensión de las biopelículas, tiene un efecto poco significativo sobre los resultados así obtenidos.

En un reactor biológico, un sustrato puede pasar por dos procesos principales: puede incorporarse en una secuencia de reacciones de degradación que lo convierten en productos intermedios y posteriormente en productos finales estables con generación de energía (estas reacciones constituyen el *catabolismo*), o puede ser parte de las reacciones *anabólicas* o *asimilativas* en las que los principales componentes bioquímicos de las células son elaborados a partir de productos intermedios mediante varias rutas de biosíntesis. El tipo y naturaleza de los sustratos asociados con estas dos rutas metabólicas están directamente relacionados con los requerimientos nutricionales de los microorganismos. Los procesos biológicos tradicionalmente diseñados para la eliminación de materia orgánica transforman una fracción del carbono orgánico en nuevo material celular a través de la biosíntesis, mientras el resto es

oxidado a CO_2 por medio de las reacciones catabólicas. También se consumen formas de nitrógeno y fósforo junto con el carbono orgánico, como parte del nuevo material sintetizado, pero en bajas proporciones determinadas por la composición química de los microorganismos. Los compuestos nitrogenados pueden ser oxidados a nitrato a través de rutas catabólicas diferentes bajo condiciones operacionales específicas. Una modificación del proceso puede asegurar la completa eliminación de nitrógeno en ausencia de oxígeno disuelto mediante la conversión de los nitratos en gas nitrógeno. La modelización de los sistemas biológicos para control y predicción del rendimiento requiere un profuso entendimiento del papel que desempeña cada sustrato particular en las reacciones metabólicas del sistema.

La Ec. 1, obtenida experimentalmente (Characklis, 1990), describe el crecimiento microbiano a base de glucosa. $\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2\text{N}$ es una fórmula empírica de la biomasa. La Ec. 1 es la suma de todas las reacciones del *metabolismo*:



El crecimiento ocurre a expensas de la energía liberada debido a las reacciones de oxidación – reducción dentro de la célula. La *energía libre* es una variable termodinámica de estado que representa el máximo trabajo útil que puede realizarse a temperatura y presión constantes. Pero este trabajo sólo puede efectuarse bajo condiciones reversibles o de equilibrio. Puesto que las células bacterianas son *sistemas abiertos*, dentro de las cuales ocurren procesos irreversibles, sólo una parte de la *energía libre* (eficiencia de utilización) puede captarse para trabajo útil, el resto se pierde en forma de calor.

El alcance del crecimiento, y de otros procesos microbianos, es función de la energía liberada debido a la transferencia de electrones y de la eficiencia de utilización de esa energía por los organismos (Characklis, 1990).

Desde el punto de vista de las reacciones químicas, los microorganismos actúan únicamente como catalizadores de una oxidación-reducción. Consecuentemente, los microorganismos no oxidan la glucosa o reducen el oxígeno, sino que intermedian la oxidación de la glucosa por el oxígeno: transfieren electrones desde la glucosa al oxígeno. La termodinámica predice que la glucosa en un ambiente aerobio será oxidada a CO_2 y H_2O bien químicamente (en un periodo largo) o mediante un mecanismo que incluye oxidación microbiana con producción de biomasa. Sin embargo, la biomasa es un producto metabolizable que también será oxidado en un sistema con un exceso de oxígeno (Figura 1).

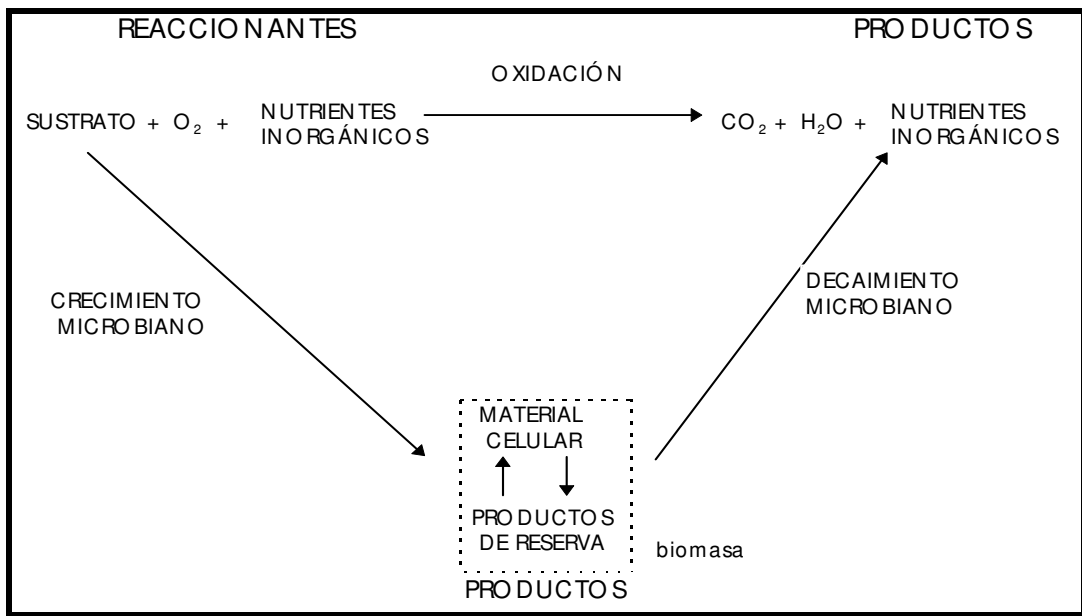


Figura 1.- La oxidación completa de un sustrato orgánico puede efectuarse mediante dos métodos: (1) oxidación química y (2) oxidación microbiana seguida de una oxidación química de las células. Las células son productos metabolizables.

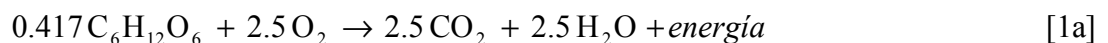
2.- ESTEQUIOMETRÍA GENERAL DEL CRECIMIENTO BACTERIANO

El proceso de crecimiento bacteriano implica que **se lleven a cabo reacciones de generación de energía y de biosíntesis**. La siguiente estequiometría describe un sistema de crecimiento microbiano a base de glucosa como sustrato:

Estequiometría global de oxidación de la glucosa:



Energía:



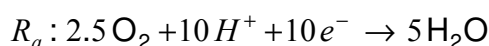
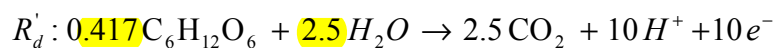
Síntesis:



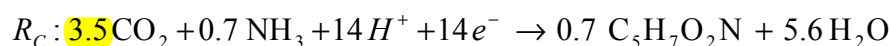
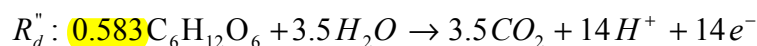
La estequiometría global (Ec. 1) es el resultado de la suma de la reacción de aporte energético (Ec. 1a) y de síntesis (Ec. 1b). La de aporte energético determina la cantidad de trabajo útil que puede ser efectuado por la célula. La reacción de síntesis consumirá parte de la energía producida. **La reacción se completa cuando toda la glucosa ha sido convertida a productos de oxidación (respiración) o de síntesis.**

A su vez cada una de las reacciones del metabolismo, energética y síntesis, es el resultado de procesos de oxidación – reducción. Por lo tanto, las ecuaciones 1a y 1b son el resultado de la combinación de dos semi-reacciones de oxidación-reducción, tal como se describe a continuación:

En el caso de la reacción energética, las semi-reacciones que se combinan son:



Por su parte, la reacción de síntesis resulta de combinar:

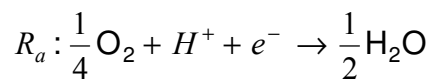
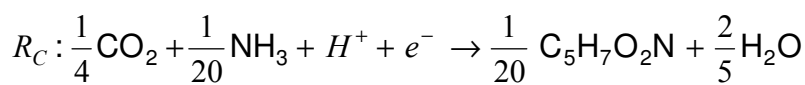
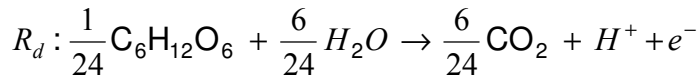


Si se suman las 4 semi- reacciones se vuelve a obtener la estequiometría global de oxidación biológica de la glucosa (Ec 1). El dador de electrones, la glucosa (sustrato: fuente de energía y de carbono en este caso), participa en ambas reacciones (semi-reacciones R'_d y R''_d). El desmembramiento de una reacción empírica global de crecimiento bacteriano fue realizado por primera vez por **McCarty en 1975** (McCarty, 1975), basándose en la estequiometría experimental de crecimiento bacteriano a base de oxidación de caseína presentada por Porges *et al.* **(1956, citado por McCarty, 1975)**.

McCarty llegó a la conclusión de que todas las estequiometrías microbianas se pueden construir mediante la combinación de 3 semi-reacciones: la semi-reacción del aceptor de electrones (R_a); la semi-reacción de la síntesis celular (R_c) y la semi-reacción del dador de electrones ($R_d = R'_d + R''_d$). Para ello solo es necesario conocer que fracción de los electrones liberados por el dador se aprovechan para producir energía. Como es lógico, la fracción remanente se utilizará para sintetizar biomasa o células. En el ejemplo **de la oxidación de la glucosa, se ve que ésta libera un total de 24 e⁻** (estrictamente 24 “eq-e⁻”). De ellos, 14 eq-e⁻ se

emplean para la síntesis celular y 10 eq-e⁻ en la reacción de energía. Así, la fracción de síntesis, f_s , resulta de $14/24 = 0.583$ eq-e⁻ celular producido/eq-e⁻ sustrato eliminado. Mientras que la fracción energética es $10/24 = 0.417$ eq-e⁻ oxígeno demandado/eq-e⁻ sustrato oxidado (en este caso el oxígeno es el aceptor de electrones). Como es lógico, $f_s + f_e = 1$, y también $f_e = 1 - f_s$.

Las 3 semi-reacciones, R_a , R_d y R_C , se pueden normalizar para 1 eq-e⁻, obteniéndose:



Así, la re-construcción de la estequiometría global, R_G , se consigue mediante:

$$R_G = R_d - f_s R_C - f_e R_a$$
$$R_G = R_d - f_s R_C - (1 - f_s) R_a \quad (2)$$

Siendo este el modelo estequiométrico bacteriano propuesto por McCarty, muy útil para propósitos de modelación de procesos biológicos y de balances de materia. McCarty propuso que la estequiometría de cualquier reacción global de crecimiento bacteriano se puede elaborar a partir del conocimiento de las 3 semi-reacciones de oxidación-reducción requeridas. El mismo construyó una serie de semi-reacciones normalizadas sobre la base de 1 eq-e⁻, con sus correspondientes valores de energía libre de Gibbs. Dichas reacciones se recogen en la Tabla 1.

El valor de f_s no es una constante. Muy al contrario depende, con proporcionalidad inversa, de la edad de las células (de la edad del fango se diría si de un proceso de fangos activos se tratase). Por lo tanto, hay un valor máximo que corresponde a los inicios de la reacción microbiana (crecimiento real), cuando el efecto del proceso de oxidación microbiana (decaimiento celular) es poco significativo. McCarty (1975) desarrolló un método termodinámico para evaluar la fracción f_s de eq-e⁻ del dador de electrones (sustrato) que se emplean en el crecimiento real celular. Dicho método se presenta en el apéndice I.

Tabla 1.- Energía libre y potencial redox de varias semi-reacciones redox

Semi-reacciones	$\Delta G^\circ(W)$ kcal/eq-e ⁻	E°_H (W) V
Reacciones de síntesis celular (R_c)		
Amonio como fuente de nitrógeno		
a.- 1/20 C ₅ H ₇ O ₂ N + 9/20 H ₂ O = 1/5 CO ₂ + 1/20 HCO ₃ ⁻ + 1/20 NH ₄ ⁺ + H ⁺ + e ⁻		
Nitrato como fuente de nitrógeno		
b.- 1/28 C ₅ H ₇ O ₂ N + 11/28 H ₂ O = 1/28 NO ₃ ⁻ + 5/28 CO ₂ + 29/28 H ⁺ + e ⁻		
Reacciones para aceptores de electrones (R_a)		
Oxígeno		
c.- 1/2 H ₂ O = 1/4 O ₂ + H ⁺ + e ⁻	18.675	0.81
Nitrato		
d.- 1/10 N ₂ + 3/5 H ₂ O = 1/5 NO ₃ ⁻ + 6/5 H ⁺ + e ⁻	17.128	0.74
Sulfato		
e.- 1/16 H ₂ S + 1/16 HS ⁻ + 1/2 H ₂ O = 1/8 SO ₄ ⁼ + 19/16 H ⁺ + e ⁻	-5.085	-0,22
Dióxido de carbono (fermentación del metano)		
f.- 1/8 CH ₄ + 1/4 H ₂ O = 1/8 CO ₂ + H ⁺ + e ⁻	-5.763	-0,25
Reacciones para dadores de electrones (R_d)		
<u>Dadores orgánicos (reacciones heterotrofas)</u>		
Agua residual doméstica		
g.- 1/50 C ₁₀ H ₁₉ O ₃ N + 9/25 H ₂ O = 9/50 CO ₂ + 1/50 HCO ₃ ⁻ + 1/50 NH ₄ ⁺ + e ⁻	-7.6	-0,33
Proteína (amino ácidos, proteínas, nitrógeno orgánico)		
h.- 1/66 C ₁₆ H ₂₄ O ₅ N ₄ + 27/66 H ₂ O = 8/33 CO ₂ + 2/33 NH ₄ ⁺ + 31/33 H ⁺ + e ⁻	-7.7	-0,33
Carbohidratos (celulosa, almidón, azúcares)		
i.- 1/4 CH ₂ O + 1/4 H ₂ O = 1/4 CO ₂ + H ⁺ + e ⁻	-10.0	-0,43
Grasas (aceites y grasas)		
j.- 1/46 C ₈ H ₁₆ O + 15/46 H ₂ O = 4/23 CO ₂ + H ⁺ + e ⁻	-6.6	-0,29
Acetato		
k.- 1/8 CH ₃ COO ⁻ + 3/8 H ₂ O = 1/8 CO ₂ + 1/8 HCO ₃ ⁻ + H ⁺ + e ⁻	-6.609	-0,29
Propionato		
l.- 1/14 CH ₃ CH ₂ COO ⁻ + 5/14 H ₂ O = 1/7 CO ₂ + 1/14 HCO ₃ ⁻ + H ⁺ + e ⁻	-6.664	-0,29
Benzoato		
m.- 1/30 C ₆ H ₅ COO ⁻ + 13/20 H ₂ O = 1/5 CO ₂ + 1/30 HCO ₃ ⁻ + H ⁺ + e ⁻	-6.892	-0,30
Etanol		
n.- 1/12 CH ₃ CH ₂ OH + 1/4 H ₂ O = 1/6 CO ₂ + H ⁺ + e ⁻	-7.592	-0,33
Lactato		
ñ.- 1/12 CH ₃ CHOHCOO ⁻ + 1/3 H ₂ O = 1/6 CO ₂ + 1/12 HCO ₃ ⁻ + H ⁺ + e ⁻	-7.873	-0,34
Piruvato		
o.- 1/10 CH ₃ COCOO ⁻ + 2/5 H ₂ O = 1/5 CO ₂ + 1/10 HCO ₃ ⁻ + H ⁺ + e ⁻	-8.545	-0,37
Metanol		
p.- 1/6 CH ₃ OH + 1/6 H ₂ O = 1/6 CO ₂ + H ⁺ + e ⁻	-8.965	-0,39
<u>Dadores inorgánicos (reacciones autotrofas)</u>		
q.- Fe ⁺² = Fe ⁺³ + e ⁻	17.780	0,77
r.- 1/2 NO ₂ ⁻ + 1/2 H ₂ O = 1/2 NO ₃ ⁻ + H ⁺ + e ⁻	9.596	
s.- 1/8 NH ₄ ⁺ + 3/8 H ₂ O = 1/8 NO ₃ ⁻ + 5/4 H ⁺ + e ⁻	8.245	0,36
t.- 1/6 NH ₄ ⁺ + 1/3 H ₂ O = 1/6 NO ₂ ⁻ + 4/3 H ⁺ + e ⁻	7.852	0,34
u.- 1/6 S + 2/3 H ₂ O = 1/6 SO ₄ ⁼ + 4/3 H ⁺ + e ⁻	-4.657	-0,20
v.- 1/16 H ₂ S + 1/16 HS ⁻ + 1/2 H ₂ O = 1/8 SO ₄ ⁼ + 19/16 H ⁺ + e ⁻	-5.085	-0,22
w.- 1/8 S ₂ O ₃ ⁼ + 5/8 H ₂ O = 1/4 SO ₄ ⁼ + 5/4 H ⁺ + e ⁻	-5.091	-0,22
x.- 1/2 H ₂ = H ⁺ + e ⁻	-9.670	-0,42
y.- 1/2 SO ₃ ⁼ + 1/2 H ₂ O = 1/2 SO ₄ ⁼ + H ⁺ + e ⁻	-10.595	-0,46

 Fuente: McCarty (1975) y Sawyer *et al.* (2001).

Nota: 1 kJ = kcal x 4,18385

El sustrato puede ser de naturaleza orgánica o inorgánica; si es orgánico también se utiliza como fuente de carbono. El número de eq-e⁻ que puede liberar el sustrato orgánico se determina como si éste fuera enteramente oxidado a CO₂ (mineralización). Una parte de los eq-e⁻ del sustrato serán transferidos al aceptor final para la generación de energía libre; el resto será incorporado a la biomasa sintetizada. Esta última fracción del sustrato no es oxidada a CO₂ sino convertida al estado de oxidación de la biomasa. Los eq-e⁻ del sustrato usados en la biosíntesis puede considerarse igual a los contenidos en la biomasa generada; en otras palabras, la cantidad de electrones que podrían liberarse si la biomasa generada fuera oxidada totalmente (mineralizada tal como antes se ha visto) a CO₂.

La Figura 2 ilustra el flujo de electrones de un crecimiento aerobio heterotrofo iniciado con 100 e⁻ y con un valor de $Y_H = 0,64$ eq-e⁻ celular/eq-e⁻ sustrato.

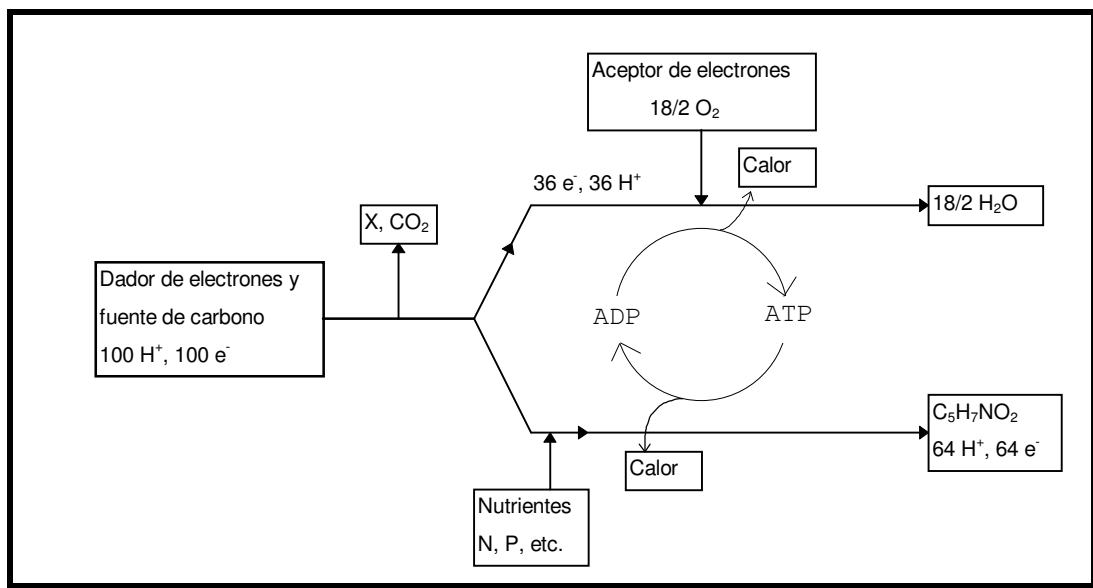


Figura 2.- Esquema del flujo de electrones en un crecimiento aerobio organotrófico (para $Y_H = 0.64$ eq-e⁻ celular/eq-e⁻ sustrato) (Reproducida de Orhon y Artan, 1994).

Cuando el dador de electrones es inorgánico, como en el caso de la nitrificación, los electrones liberados en su oxidación siguen también dos vías diferentes: una porción es transferida al aceptor final de electrones para generar energía libre como en el caso del crecimiento heterotrofo; la fracción restante definida en términos de *producción autotrofa*, Y_A , se utiliza para reducir la fuente de carbono inorgánico, CO₂, al nivel de oxidación de biomasa (Fig. 3).

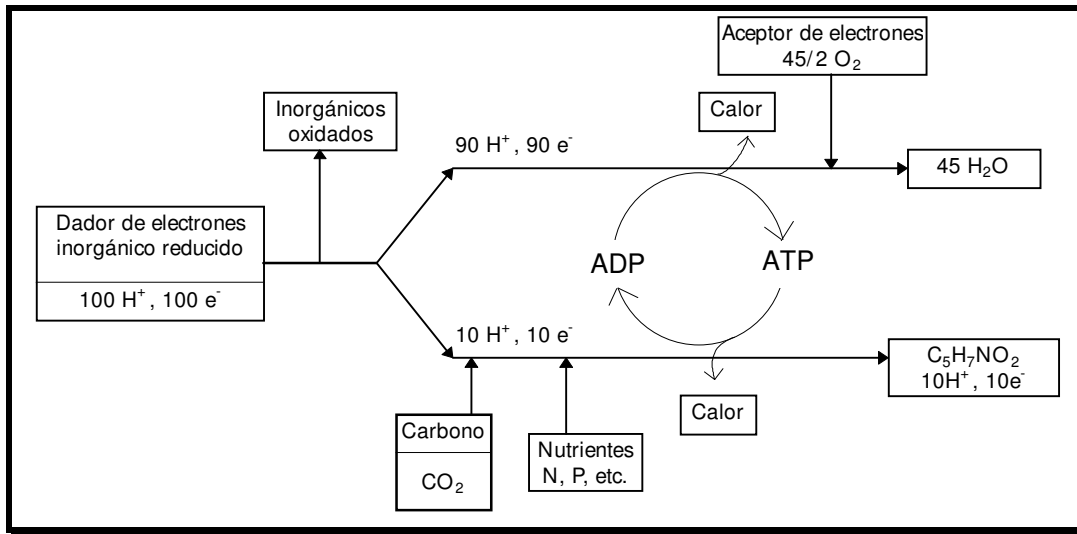


Figura 3.- Esquema del flujo de electrones en un crecimiento aerobio litotrófico (para $Y_A = 0.1$ eq-e⁻ celular/eq-e⁻ sustrato) (Reproducida de Orhon y Artan, 1994).

El reparto de los eq-e⁻ del sustrato entre las reacciones de energía y biosíntesis puede determinarse mediante un balance de energía del proceso de crecimiento. Este balance está estrechamente relacionado con dos factores principales: (1) La energía requerida para la biosíntesis de una cantidad unitaria de biomasa, y (2) La energía utilizable que puede derivarse desde una cantidad unitaria de sustrato. Este segundo factor es función del estado de oxidación de la fuente de carbono así como del dador y del aceptor de electrones que toman parte en la reacción de energía. Consecuentemente, la magnitud del coeficiente f_s depende tanto de los microorganismos involucrados como del sustrato utilizado, ya que diferentes microorganismos pueden crecer con diferentes eficiencias de transferencia de energía, k_e , a base de un mismo sustrato.

3.- CONCEPTO DE PRODUCCIÓN EN LAS REACCIONES MICROBIANAS

McCarty (1975) en su trabajo pionero diferenció el coeficiente de síntesis en términos de “eq-e⁻ celular/eq-e⁻ dador (o sustrato)” del coeficiente en términos másicos (p.ej.: g DQO celular/g DQO sustrato). En el primer caso, el coeficiente se simboliza como f_s . En el segundo, se habla de producción celular y se emplea el símbolo Y . Como se verá en lo que sigue, los valores numéricos de f_s e Y coinciden solo si Y se expresa en g DQO celular/g DQO sustrato (caso del crecimiento heterotrofo). Si las unidades de Y cambian, por ejemplo: g

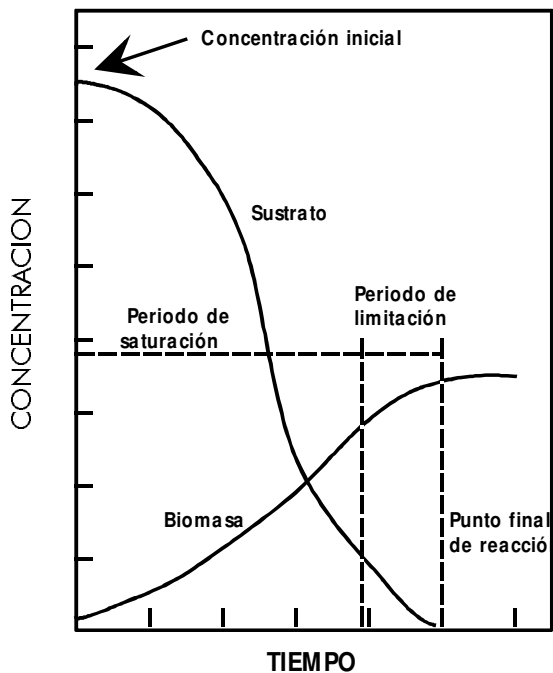


Figura 4.-Desarrollo del crecimiento microbiano en un sistema cerrado (batch) que ilustra el incremento de biomasa así como el consumo de sustrato debido al metabolismo microbiano. (Reproducida de: Characklis, 1990).

DQO celular/g N-NH₄⁺ (como en el crecimiento de nitrificantes), entonces los valores de f_s e Y serán diferentes.

En los procesos biológicos aerobios, la eliminación de sustrato va acompañada de generación de biomasa y consumo de oxígeno. El concepto de producción es una importante herramienta de modelación para la correcta valoración de la generación de biomasa y del consumo de oxígeno relacionados con la eliminación de sustrato.

La interpretación y evaluación del coeficiente de producción depende del modelo conceptual seleccionado para ilustrar las reacciones metabólicas involucradas. Se suele adoptar un modelo que comprende un sistema de reacciones secuenciales. En primer lugar, todo el

sustrato sirve como fuente de energía y de carbono para la generación de biomasa; en segundo término, la biomasa experimenta *metabolismo endógeno*: se consume como dadora de electrones para satisfacer los requerimientos energéticos de las funciones básicas del mantenimiento celular. Así, pueden definirse dos procesos claramente identificables, crecimiento y metabolismo endógeno, determinando cada uno relaciones cuantitativas entre parámetros importantes.

Experimentalmente, no es posible identificar por separado estos procesos simultáneos y sólo puede observarse el resultado neto de la reacción global. La concentración de sustrato decrece en el tiempo debido al crecimiento celular mientras el perfil de biomasa es el resultado neto de la síntesis y del metabolismo endógeno (Fig. 4). Inicialmente el efecto relativo del metabolismo endógeno sobre el perfil de biomasa es prácticamente despreciable, pero incrementa de forma continua porque a medida que la reacción avanza menos carbono y energía quedan disponibles para el crecimiento, y ya que la acumulación de biomasa va aparejada con un incremento de las necesidades del mantenimiento celular, porciones muy grandes de biomasa se consumen para afrontar el incremento de esta demanda. La *producción*

neta del sistema, Y_N , puede calcularse sobre la base de los cambios observados en la concentración de sustrato y biomasa. La producción neta no es una constante, más bien es un coeficiente variable. Puede describirse como una función de las condiciones de operación. Si los cálculos de la producción se hacen con los datos iniciales de los experimentos, excluyendo en teoría la interferencia del metabolismo endógeno, el resultado converge a un valor constante, definido como el **coeficiente de producción real, Y** . La producción real refiere sólo al mecanismo de crecimiento, y como tal se emplea como constante estequiométrica para introducir este mecanismo en los modelos.

Esta observación tiene una importante consecuencia: un parámetro se considera como un coeficiente constante cuando describe o responde a un único proceso, pero cuando involucra más de un mecanismo pasa a ser una variable de modelación.

El concepto de producción no puede ser interpretado y evaluado sin la estequiometría del proceso considerado. La estequiometría comprende un balance de materia entre los reaccionantes y productos de una reacción, donde el coeficiente de producción es la proporción cuantitativa entre los componentes importantes. La estequiometría de una reacción es independiente de su velocidad, y es válida para cada parte de la reacción conforme ésta se lleva a cabo. Puede cambiar para las diferentes fuentes de carbono y energía, ya que son muy específicas del sustrato, llevando a diferentes expresiones estequiométricas para cada sustrato.

En procesos biológicos las condiciones observadas no reflejan una estequiometría fija porque involucran varios mecanismos que tienen efectos relativos variables bajo diferentes condiciones de operación. Por lo tanto, para cada grupo de condiciones operacionales habrá diferentes estequiometrías globales que definan una producción observada para la operación del momento. La variabilidad de la producción observada y de la estequiometría global tiene importantes efectos sobre la producción de fangos y las necesidades nutricionales de un sistema biológico.

Un importante concepto fisiológico es la ley del factor limitante o del mínimo atribuida a Liebig: “*La velocidad y/o alcance de un proceso microbiano están controlados por el factor ambiental que sea el limitante*”. Sin embargo, existen dos diferencias importantes que se deben considerar: 1º) Hay nutrientes o factores limitantes estequiométricos y cinéticos, y no necesariamente se trata del mismo factor en ambos casos, y 2º) Más de un factor puede presentar limitaciones de carácter cinético o estequiométrico en un mismo proceso microbiano.

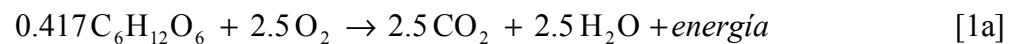
El factor limitante estequiométrico es el primero en agotarse durante el crecimiento discontinuo de una población microbiana. El factor limitante cinético limita la velocidad pero no

necesariamente el alcance de la reacción. El factor limitante estequiométrico permite un conveniente y reproducible punto o estado final para determinar la estequiometría de las reacciones microbianas en reactores discontinuos.

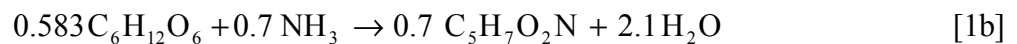
3.1.- Expresión de la producción

Se vuelve a escribir las ecuaciones del crecimiento microbiano a base de glucosa como sustrato:

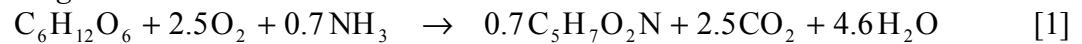
Energía:



Síntesis:



Estequiometría global:



Las unidades del coeficiente de producción estarán en función de las unidades usadas para la medición de la biomasa y el sustrato. No se debe menospreciar la importancia que tiene la consistencia de las unidades en los balances de materia. Generalmente, la concentración de biomasa se define en términos de SSV; mientras que la concentración de sustrato en DBO₅, DQO o COT. Si se define el sustrato y la biomasa en términos de DQO se facilita el entendimiento de la estequiometría y cinética de los principales procesos de un sistema biológico. También es una forma conveniente de relacionar el consumo de oxígeno con la eliminación de sustrato y la generación de biomasa.

Si en el crecimiento bacteriano heterotrofo se designa como Y_H el coeficiente de producción de biomasa, de la ecuación 1 se puede deducir los siguientes valores:

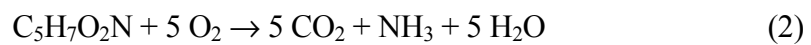
$$Y_H = \frac{0.7 \text{ mol biomasa}}{\text{mol glucosa}} \times \frac{\text{mol glucosa}}{180 \text{ g glucosa}} \times \frac{113 \text{ g biomasa}}{1 \text{ mol biomasa}} = 0.44 \text{ g SV / g glucosa}$$

Si se analiza la reacción de generación de energía (Ec. 1a), también llamada de “mineralización” del sustrato orgánico se deduce que:

$$Y_{O/S} = \frac{2.5 \text{ mol } - O_2}{0.417 \text{ mol } - \text{glucosa}} \times \frac{32 \text{ g } O_2}{1 \text{ mol } - O_2} \times \frac{1 \text{ mol } - \text{glucosa}}{180 \text{ g } \text{glucosa}} = 1.06 \text{ g } O_2 / \text{g } \text{glucosa}$$

Donde, $Y_{O/S}$ es el coeficiente estequiométrico entre oxígeno y sustrato. Es decir, 1 g de glucosa ejerce una demanda “química” de 1,067 g O_2 para oxidarse a productos finales. También se puede calcular de la Ec. 1a que 1 mol de glucosa ejerce una DQO de 192 g O_2 (=180 x 1,067).

Por otra parte, la “mineralización” de la biomasa (respiración endógena) da como resultado la siguiente ecuación estequiométrica:



Siendo $Y_{O/X}$, el coeficiente estequiométrico entre oxígeno y el sustrato endógeno (la biomasa). Haciendo cálculos se ve que $Y_{O/X} = 160 \text{ g DQO/mol-célula} = 1.42 \text{ g DQO/g SV}$ (si se supone que la biomasa es 100 % volátil, los 113 g que pesa 1 mol de biomasa serían de sólidos volátiles, SV). Teniendo en cuenta los valores y unidades de $Y_{O/S}$ y de $Y_{O/X}$, Y_H se puede expresar como:

$$Y_H = \frac{0.44 \text{ g SV}}{\text{g } \text{glucosa}} \times \frac{1 \text{ g } - \text{glucosa}}{1.067 \text{ g DQO}} \times \frac{1.42 \text{ g DQO}}{1 \text{ g SV}} = 0.58 \text{ g DQO}_{\text{celular}} / \text{g DQO}_{\text{sustrato}}$$

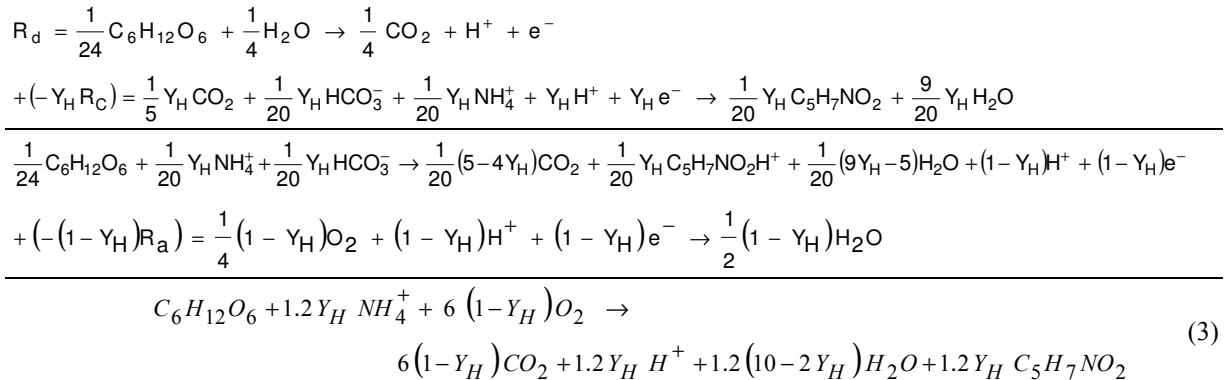
Por otra parte, teniendo en cuenta las semi-reacciones del dador de electrones (R_d) y de síntesis (R_C), Y_H se puede expresar como:

$$Y_H = \frac{0.7 \text{ mol biomasa}}{\text{mol } \text{glucosa}} \times \frac{\text{mol } \text{glucosa}}{24 \text{ eq } - e^-} \times \frac{20 \text{ eq } - e^-}{1 \text{ mol biomasa}} = 0.58 \text{ eq } - e_C^- / \text{eq } - e_S^-$$

Es decir, que en el caso del crecimiento heterotrofo, si Y_H se expresa en g DQO_C/DQO_S , tendrá el mismo valor numérico que fs.

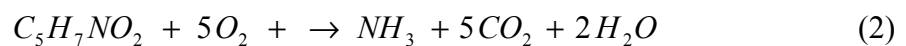
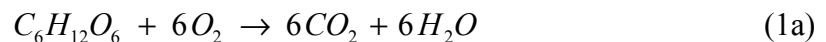
3.2.- Estequiometría del crecimiento aerobio heterotrofo

Se toma como ejemplo el caso de la oxidación microbiana de glucosa.



3.2.1.- Relaciones estequiométricas

Para utilizar la **DQO como unidad homogénea de medida de la glucosa y la biomasa**, es necesario plantear la reacción de oxidación química (mineralización) de estos compuestos (Ec. 1a modificada y Ec. 2):



Tal como ya se ha visto, **los factores de conversión son 192 g DQO/mol glucosa** (Ec. 1a) y **160 g DQO/mol de biomasa** (Ec. 2).

Las Ecs. 1a, 2, y 3, hacen posible determinar los coeficientes estequiométricos de los procesos de crecimiento aerobio heterotrofo y de respiración endógena, información necesaria para rellenar la matriz de procesos de modelos como el ASM1 (de fangos activos) o el BIOSIM (de biopelículas). Cabe recordar, que la cinética de los procesos es general para todos los componentes involucrados. Uno de los componentes de la reacción hace de pivote estequiométrico, lo que suele llamarse normalización. Generalmente, la biomasa es el componente que hace de pivote, por eso el valor de su coeficiente estequiométrico en la matriz es 1, ya que resulta de dividir por sí mismo su coeficiente estequiométrico (en el caso del crecimiento aerobio a base de glucosa, Ec. 3: $1.2 Y_H/1.2 Y_H$). El signo de cada coeficiente dependerá de si el componente afectado aparece o desaparece como consecuencia de la transformación considerada en cada caso.

Así, el coeficiente estequiométrico del consumo de oxígeno durante el crecimiento aerobio heterotrofo sería:

$$-\frac{6(1 - Y_H) \text{ mol } O_2}{1.2 Y_H \text{ mol biomasa}} \times \frac{1 \text{ mol biomasa}}{160 \text{ g DQO}} \times \frac{32 \text{ g DQO}}{1 \text{ mol } O_2} = -\frac{1 - Y_H}{Y_H} \frac{\text{g } O_2}{\text{g DQO}_{\text{celular}}}$$

Por analogía, el coeficiente estequiométrico de consumo de sustrato resulta: $-1/Y_H$ g DQO_{glucosa} / g DQO_{celular} .

El consumo de nitrógeno amoniacal en la síntesis celular es proporcional a la composición de la biomasa: $-i_{XB}$ g N/g DQO_C . El parámetro i_{XB} representa el contenido de nitrógeno de la fracción activa de biomasa expresado en g N/g DQO celular. A partir de $C_5H_7NO_2$ esta aproximación produce para i_{XB} un valor de 0.0875 g N/g DQO celular ó 0.124 g N/g SV. Según Eckenfelder (1992) en fangos activos, el valor de i_{XB} decrece con la edad del fango hasta estabilizarse en 0.07 g N/g SSV, que corresponde a 0.05 g N/g DQO . Los valores en la bibliografía señalan un rango de 0.01 a 0.07 g N/g DQO (Henze *et al.*, 1987).

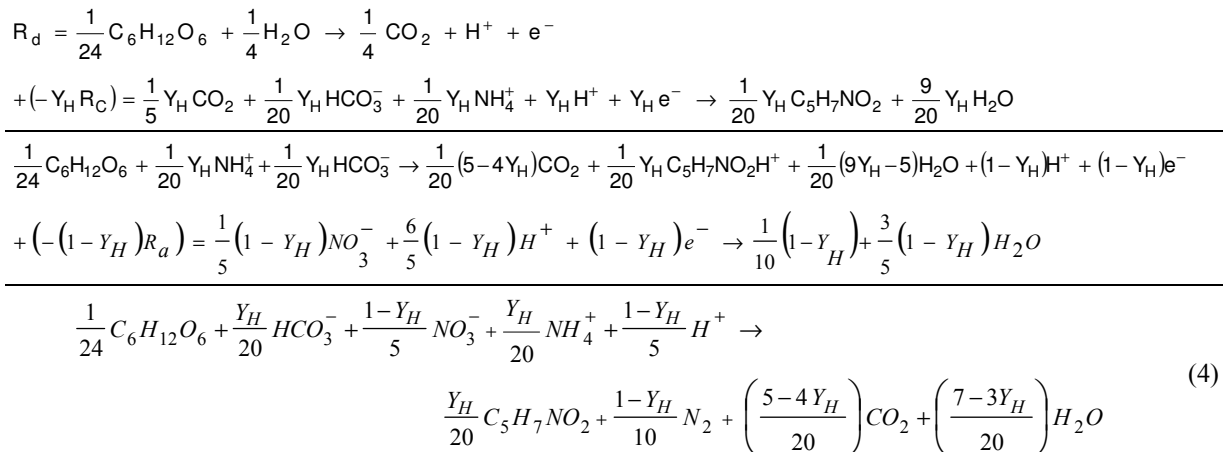
El coeficiente Y_H puede evaluarse experimentalmente o calcularse por el método descrito por McCarty (1975) basado en consideraciones termodinámicas (Apéndice I). La Tabla 2 muestra una comparación entre valores experimentales y teóricos del coeficiente de producción heterotrofa para varios dadores y aceptores de electrones.

Tabla 2.- Valores de Y_H , experimentales y teóricos, de crecimiento heterotrofo (Fuente: McCarty, 1975)

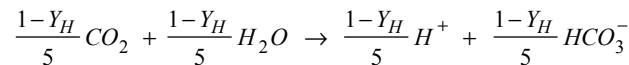
Dador de e ⁻	Aceptor de e ⁻	Y_H ($DQO_{\text{biomasa}} / DQO_{\text{sustrato}}$)	
		Experimental	Calculado ($k_e = 0.6$)
Glucosa	O ₂	0.79	0.72
Fructosa	O ₂	0.74	0.72
Lactosa	O ₂	0.74	0.72
Sucrosa	O ₂	0.75	0.72
Glicina	O ₂	0.52	0.64
Alanina	O ₂	0.52	0.64
Glutamato	O ₂	0.55	0.64
Benzoato	O ₂	0.46	0.60
Propionato	O ₂	0.58	0.59
Acetato	O ₂	0.58	0.59
Metanol	NO ₃ ⁻	0.36	0.67
Octanoato	CO ₂	0.069	0.052
Metanol	CO ₂	0.15	0.21
Benzoato	CO ₂	0.11	0.062
Propionato	CO ₂	0.069	0.048
Acetato	CO ₂	0.06	0.047
Glucosa	CO ₂	0.27	0.28

3.3.- Estequiometría del crecimiento anóxico heterotrofo

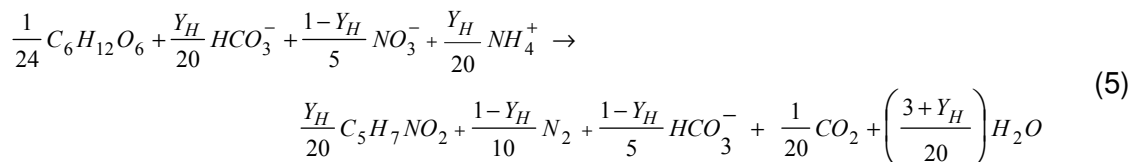
Al igual que el crecimiento heterotrofo aerobio, el anóxico se basará en glucosa como fuente de carbono y de energía. También, para la síntesis hay disponibilidad de nitrógeno amoniacal. El aceptor de electrones en la reacción energética pasa a ser el nitrato en lugar de oxígeno.



Para equilibrar los protones generados debe producirse alcalinidad en el sistema:

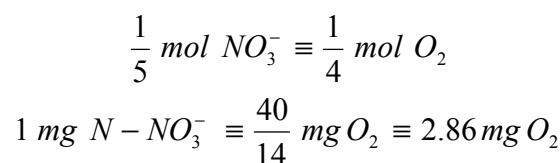


Incorporando la alcalinidad se obtiene:



La Ec. 5 constituye la estequiometría general del crecimiento heterotrofo anóxico a base de glucosa. Como en los otros casos, para la construcción de la matriz estequiométrica de los modelos, la Ec. 5 se suele normalizar con respecto a la biomasa.

De las semi-reacciones energéticas del oxígeno y nitrato se deduce que:



3.3.1.- Relaciones estequiométricas

En el caso de la glucosa sería: $-\frac{1}{Y_H} \frac{g DQO_S}{g DQO_C}$

La alcalinidad producida tendría un término negativo, debido al consumo asociado al amonio empleado en la síntesis celular, y un término positivo debido a la alcalinidad producida para mantener el equilibrio de carbonatos debido a los protones liberados en la reducción del nitrato a nitrógeno gas y agua:

$$-\frac{Y_H/20}{Y_H/20} \frac{mol HCO_3^-}{mol biomasa} \times \frac{1 mol biomasa}{14 g N} \times \frac{i_{XB} g N_C}{g DQO_C} = -\frac{i_{XB}}{14} \frac{mol HCO_3^-}{g DQO_C}$$

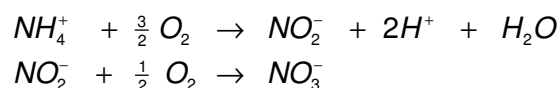
$$\frac{(1 - Y_H)/5}{Y_H/20} \frac{mol HCO_3^-}{mol biomasa} \times \frac{1 mol biomasa}{160 g DQO_C} = \frac{1 - Y_H}{40 Y_H} \frac{mol HCO_3^-}{g DQO_C}$$

El nitrógeno amoniacal, al igual que en el caso aerobio, se consume proporcionalmente a la composición de la biomasa, es decir: $-i_{XB} g N_C/g DQO_C$. El nitrato consumido se obtiene mediante:

$$-\frac{\frac{1-Y_H}{5}}{\frac{Y_H}{20}} = -\frac{4(1-Y_H)}{Y_H} \frac{mol NO_3^-}{mol biomasa} \times \frac{14 g N_a}{mol NO_3^-} \times \frac{mol biomasa}{160 g DQO_C} = -\frac{1-Y_H}{2.86 Y_H} \frac{g N}{g DQO_C}$$

3.4.- Estequiometría de la nitrificación

El trabajo de Winogradsky (1890, citado por Orhon, 1994) estableció que la nitrificación está asociada con el metabolismo de un grupo de bacterias quimioautótrofas, obligadas a utilizar compuestos inorgánicos de nitrógeno como fuente de energía. Las especies del género *Nitrosomonas* derivan su energía de la oxidación del amoníaco a nitrito, y las del género *Nitrobacter* dependen de la oxidación del nitrito como su fuente de energía:



Otros grupos de bacterias como las *Nitrosococcus*, *Nitrospira* y *Nitrosolobus* también oxidan amonio a nitrito. La segunda etapa, oxidación de nitrito a nitrato, también es llevada a efecto por bacterias como las *Nitrospira*, *Nitrococcus* y *Nitrocystis*.

Tradicionalmente, se ha aceptado que las bacterias nitrificantes obtienen el carbono necesario para la síntesis celular del CO_2 , CO_3^- y HCO_3^- . Sin embargo, algunos estudios han demostrado que tanto las *Nitrosomonas* como las *Nitrobacter* son capaces de incorporar varios compuestos orgánicos, tales como el piruvato, acetato, etc. Estas incorporaciones mejoran mucho su crecimiento (Clarck y Schmidt, 1966; Delwiche y Finstein, 1965, citados por Orhon, 1994). La oxidación heterotrofa del amoniaco y de algunos compuestos de nitrógeno orgánico para producir pequeñas cantidades de nitrito ha sido demostrada para una variedad de microorganismos. Esta oxidación no va más allá de nitrito, que suele desaparecer por asimilación. Los mecanismos heterotrofos no se consideran significativos en los sistemas naturales ni en los tratamientos biológicos, por lo que la nitrificación se evalúa sobre la base de los principios bioquímicos asociados con los microorganismos quimioautotrofos.

Estudios paralelos para detectar otras fuentes de energía han revelado que amonio y nitrito son los únicos compuestos asociados con la generación de energía de las quimioautotrofas nitrificantes. También se ha visto que la oxidación del NH_3 podría tener lugar sin que se produzca crecimiento celular, siendo la energía disipada como calor en vez de usarse para síntesis, pero ningún crecimiento celular puede tener lugar sin oxidación de NH_3 . En otras palabras, un compuesto que inhiba la oxidación del amonio inhibiría también el crecimiento, aunque la inhibición del crecimiento celular no necesariamente detiene la oxidación del amoniaco.

La estequiometría de la nitrificación define un proceso quimioautotrofo donde el amonio sirve de dador de electrones, el oxígeno de aceptor y el CO_2 de fuente de carbono.

La semi-reacción para la oxidación de NH_4^+ a NO_3^- por medio de dos grupos diferentes de bacterias puede ser la siguiente (McCarty, 1975):



Es decir que $1/8$ mol N- NH_4^+ libera 1 eq- e^- . La oxidación del amonio está inmersa tanto en la reacción energética como en la de biosíntesis. Una fracción de los electrones liberados por la oxidación del amonio es transferida al oxígeno en la reacción energética, mientras la fracción

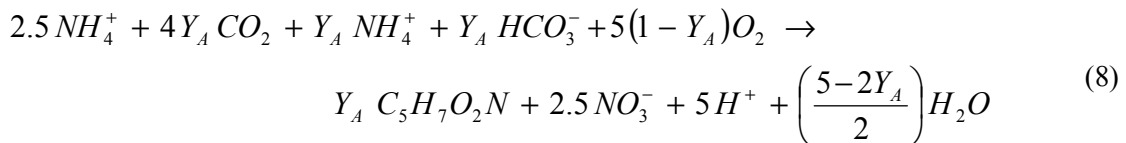
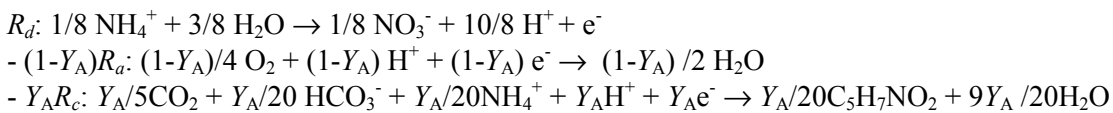
remanente se utiliza como agente reductor para convertir el CO_2 al nivel de oxidación de las células.

Una expresión estequiométrica puede desarrollarse si se conoce el coeficiente de producción Y_A^I , asociado con el crecimiento de las nitrificantes:

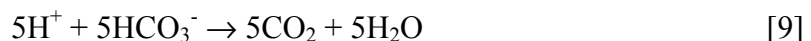
$$R_G = R_d - Y_A R_c - (1 - Y_A) R_a \quad [7]$$

La expresión anterior establece que por cada electrón liberado debido a la oxidación del amonio, $(1 - Y_A)$ eq- e^- son transferidos al O_2 para generación de energía, y que Y_A eq- e^- son gastados en la biosíntesis.

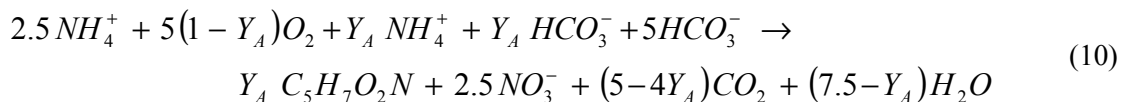
Asumiendo que $\text{C}_5\text{H}_7\text{NO}_2$ describe la composición de la biomasa nitrificante, las siguientes semi-reacciones pueden definir el proceso de crecimiento en la nitrificación:



La nitrificación genera protones, por lo que el proceso consumirá una alcalinidad equivalente a la cantidad de protones liberados:



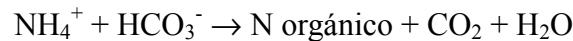
Añadiendo la alcalinidad demandada se obtiene:



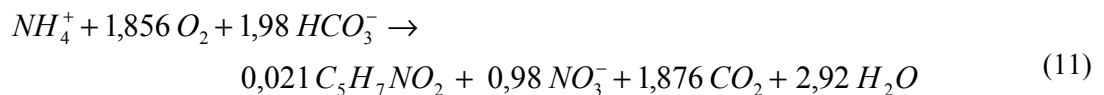
Hay que notar que se produce otro consumo de alcalinidad (Y_A moles HCO_3^-) correspondiente al amonio (Y_A moles NH_4^+) que es usado como fuente de nitrógeno en la biosíntesis y

¹ Por comodidad se utiliza Y_A tanto para la base eq- e^- como para la base másica. El valor de Y_A dependerá de la base utilizada.

convertido a nitrógeno orgánico en los constituyentes celulares según la siguiente ecuación modelo:



El valor de $Y_A = 0.24 \text{ g DQO}_C/\text{g N}$ (o $Y_A = 0.0525 \text{ eq-e}^- \text{ cél}/\text{eq-e}^- \text{ N}$), es el más aceptado para la producción nitrificante global que caracteriza la nitrificación (Henze *et al.*, 1987). La estequiometría de la nitrificación normalizada para 1 mol de amonio derivada a partir de $Y_A = 0.0525 \text{ eq-e}^- \text{ cél}/\text{eq-e}^- \text{ N}$ resulta:



3.4.1.- Relaciones estequiométricas

La ecuación general (Ec. 10) puede usarse para evaluar los parámetros estequiométricos significativos asociados con el proceso de nitrificación: demanda de oxígeno, consumo de amonio, producción de nitrato y consumo de alcalinidad.

La demanda de oxígeno debido al crecimiento de las nitrificantes puede expresarse como:

$$-\frac{5(1 - Y_A) \text{ mol O}_2}{Y_A \text{ mol biomasa}} \times \frac{1 \text{ mol biomasa}}{160 \text{ g DQO}} \times \frac{32 \text{ g DQO}}{1 \text{ mol O}_2} = -\frac{1 - Y_A}{Y_A}$$

En la expresión anterior Y_A está expresada en $\text{eq-e}^-_{\text{celular}}/\text{eq-e}^-_{\text{N}}$. En el modelo se usará como unidad $\text{g DQO}_{\text{celular}}/\text{g N}$, por lo que transformando unidades el coeficiente queda:

$$1 \frac{\text{eq e}^-_{\text{celular}}}{\text{eq e}^-_{\text{N}}} = 4.57 \frac{\text{g DQO}_{\text{celular}}}{\text{g N}}$$

$$-\frac{1 - \frac{Y_A}{4.57}}{\frac{Y_A}{4.57}} = -\frac{4.57 - Y_A}{Y_A} \frac{\text{g O}_2}{\text{g DQO}_{\text{celular}}}$$

El amonio se consume en síntesis y en oxidación, así su coeficiente estequiométrico resulta: $(-i_{XB} - 1/Y_A)$ g N/g DQO_C. El de nitrato: $1/Y_A$ g N/g DQO_C.

La nitrificación consumirá un mol de HCO_3^- por mol de N-NH₃ incorporado a las células, adicionalmente a los dos moles de HCO_3^- por mol de N-NH₄⁺ oxidado. Así el coeficiente estequiométrico resulta:

$$1 \frac{\text{mol HCO}_3^-}{\text{mol - biomasa}} \times \frac{1 \text{ mol - biomasa}}{14 \text{ g N}} \times \frac{i_{XB} \text{ g N}}{\text{g DQO}_C} = \frac{i_{XB}}{14} \frac{\text{mol HCO}_3^-}{\text{g DQO}_C}$$
$$\frac{5}{Y_A} \frac{\text{mol HCO}_3^-}{\text{mol - biomasa}} \times \frac{1 \text{ mol - biomasa}}{160 \text{ g DQO}_C} = \frac{4.57}{32 Y_A} \frac{\text{mol HCO}_3^-}{\text{g DQO}_C} = \frac{1}{7 Y_A} \frac{\text{mol HCO}_3^-}{\text{g DQO}_C}$$

4.57

Sumando se obtiene: $\left(-\frac{i_{XB}}{14} - \frac{1}{7 Y_A} \right)$ moles HCO_3^- /g DQO_C celular

La ecuación 11 (con $Y_A = 0.0525$ eq-e⁻ cél/eq-e⁻ N) indica una demanda de 1.894 moles de oxígeno por mol de nitrato formado, es decir 4.33 g O₂/g N-NO₃⁻. También, predice un consumo de 1.98 moles de HCO_3^- por mol de N-NH₄⁺. Esto es equivalente a un consumo de alcalinidad de 7.07 g CaCO₃/g N-NH₄⁺. El consumo de alcalinidad es un factor importante en el diseño de los procesos de nitrificación. La producción nitrificante es muy baja comparada con la heterotrofa. Se ve de la ecuación 11 que pueden generarse solo 0.021 moles de biomasa por la eliminación de un mol de N-NH₄⁺. Esta proporción corresponde a una producción de 0.17 g biomasa/g N-NH₄⁺ eliminado.

4.- COMPOSICIÓN ELEMENTAL DE LA BIOMASA

Una de las dificultades para determinar la composición celular microbiana es la definición de lo que es biomasa. En la mayoría de los casos, biomasa incluye la materia celular más cualquier producto que esté íntimamente asociado con las células, tal como las sustancias poliméricas extracelulares (EPS por sus siglas en inglés). Ya que los equivalentes de oxígeno de la materia celular y EPS son similares es difícil detectar cambios en las fracciones relativas de EPS y células con análisis como la DQO insensibles a estos cambios (Grady *et al.*, 1975).

Desde un punto de vista práctico, la biomasa se analiza sobre una base de peso seco, no teniendo en cuenta su contenido de agua que puede representar un 80 al 90% del peso total. Rigurosamente hablando, el 90 % del peso seco de biomasa es materia orgánica y el restante 10 % es inorgánico. El residuo inorgánico contiene Fe, Ca, Mg, Na, y trazas de otros elementos tales como Mn, Cu, Zn, etc.

Una composición orgánica promedio de los microorganismos considera un 50 – 55 % de C; 25 – 30 % de O; 10 – 15 % de N; 6 – 10 % de H; 1 – 3 % de P y 0.5 - 1.5 % de S. Bajo esta óptica, la fórmula empírica más aceptada para representar la biomasa orgánica es $C_5H_7NO_2$ (Orhon y Artan, 1994). Esta fórmula no contiene P y S porque ha sido expresada de la manera más simple posible. Cuando se evalúa la estequiometría de eliminación de fósforo pueden usarse fórmulas más elaboradas tales como $C_{60}H_{87}O_{23}N_{12}P$ ó $C_{118}H_{170}O_{57}N_{17}P$ (McCarty, 1970; Sawyer, 1956; cita Orhon, 1994).

4.1.- Formación de productos: influencia sobre la producción

Las sustancias poliméricas extracelulares (EPS) son productos extracelulares formados por las bacterias, siendo de gran importancia en los sistemas biopelícula.

La formación de productos bacterianos, especialmente EPS, tiene una importancia crítica al interpretar las determinaciones de producción de biomasa. En el caso de *Ps. aeruginosa*, obviar la formación de productos lleva a sobre-estimar la producción celular. Robinson *et al.* (1984) usando un quimiostato y agrupando la biomasa en un solo término calcularon una producción de *Ps. aeruginosa* igual a 0.66 g C-biomasa formada/g C-glucosa consumida. Si se considera el C de los polímeros por separado, $Y_{X/S} = 0.3$ g C-biomasa/g C-glucosa. Es decir que parte del carbono del sustrato fue canalizado hacia la síntesis de EPS. Por tanto, el carbono del sustrato (C-sustrato) es destinado hacia los siguientes procesos: (1) C-sustrato se oxida para suministrar energía para la síntesis celular, (2) C-sustrato se utiliza para C-celular, (3) C-sustrato se oxida para aportar energía para la síntesis de EPS, y (4) C-sustrato se emplea para C-EPS

5.- DEMANDA DE NUTRIENTES

Cierto número de sustancias metálicas y algunas inorgánicas son necesarias para el metabolismo, son *nutrientes esenciales*. El nitrógeno, fósforo y azufre están en esta categoría.

Otros elementos como Mg, Ca, K, Fe, Mn, Zn, Cu y Co, esenciales también, son llamados *elementos trazas* debido a la pequeña cantidad en que se necesitan.

El carbono es eliminado del agua residual por dos vías: (1) Por conversión en CO₂ a través de reacciones energéticas, y (2) Por incorporación a la biomasa a través de reacciones de biosíntesis. Las reacciones de biosíntesis están ligadas al consumo de nutrientes esenciales tales como N y P en una proporción determinada por la composición elemental de la biomasa. El impacto de este factor se define en términos prácticos mediante las razones C/N y C/P medidas en el agua residual a ser tratada. Si estas proporciones son muy altas en comparación con los requerimientos microbianos, las reacciones de energía y biosíntesis no se satisfacen entre sí, con el resultado de una baja eficiencia en la eliminación del carbono. Desde un punto de vista cinético, el carbono no puede actuar como el sustrato limitante, y se requiere un suministro externo de nutrientes para incrementar el rendimiento del sistema. Si las razones C/N o C/P son muy bajas, como es el caso típico de las aguas residuales urbanas, sólo pueden alcanzarse eliminaciones parciales de N y P. Los primeros estudios señalaban que las relaciones eran 17 - 32 para DBO₅/N y 90 - 150 para DBO₅/P, en sistemas con óptima operación (Sawyer, 1956). Posteriormente, fueron propuestas razones DBO₅/N/P y DQO/N/P de 100/5/1 y 150/5/1 para definir los requerimientos mínimos de nutrientes de fangos activos convencionales.

La demanda microbiana de nutrientes está estrechamente relacionada con la cantidad neta de biomasa producida. Conforme cambia el valor de producción observada, tanto la cantidad eliminada de nutrientes como la demanda nutricional mínima del sistema, están sujetos a similar variación. La estequiometría global expresada por la semi-reacción de síntesis también refleja la relación entre los requerimientos nutricionales de la biomasa y la producción. Si la composición celular se asume como C₅H₇NO₂, la cantidad de N incorporada a la biomasa por eq-e⁻ de sustrato eliminado es:

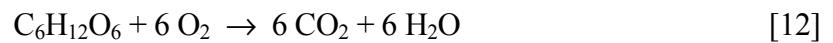
$$Y_{NH} \frac{\text{eq} - e^{-} \text{ biomasa}}{\text{eq} - e^{-} \text{ sustrato}} \times \frac{1/20 \text{ mol biomasa}}{\text{eq} - e^{-} \text{ biomasa}} \times \frac{14 \text{ g N}}{\text{mol biomasa}} = 0.7 Y_{NH} \text{ g N} / \text{eq} - e^{-} \text{ sustrato}$$

Como 1 eq-e⁻ sustrato es igual a 8 g DQO (semi-reacción de reducción del oxígeno, R_a):

$$N/DQO = \frac{0.7 Y_H}{8} \text{ g N/g DQO}$$

6.- RELACIÓN ESTEQUOMETRÍA – CINÉTICA DE REACCIONES

Para definir la estequiometría de una reacción, los coeficientes estequiométricos deben ser determinados. Por ejemplo, considerar la oxidación química de la glucosa (mineralización):



Los coeficientes estequiométricos para glucosa, oxígeno, CO_2 y agua son -1, -6, 6, y 6, respectivamente. Las relaciones estequiométricas aportan un método conveniente para comparar las velocidades de reacción de los componentes de la reacción. Si la velocidad de producción del componente i es $r^{(i)}$, entonces para la reacción descrita en la Ec. 12, se tiene:

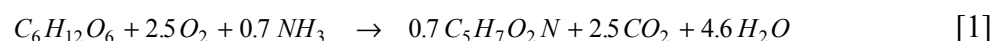
$$r^{\text{CO}_2} = r^{\text{H}_2\text{O}} = -6 r^{\text{glucosa}} = -r^{\text{O}_2} \quad [13]$$

Estas expresiones consideran el número de moles de cada componente que ha reaccionado en un tiempo t . En este caso (Ec. 12), en un tiempo t han reaccionado 6 moles de O_2 y solo 1 mol de glucosa, por lo tanto, en términos molares la velocidad de reacción del oxígeno es 6 veces mayor que la de la glucosa.

En reacciones elementales, la velocidad global del proceso, r , es la misma independientemente del componente de reacción medido. Por lo tanto, para una reacción que involucra k componentes:

$$r^{(i)} = a_i \frac{r^{(1)}}{a_1} = a_i \frac{r^{(2)}}{a_2} = \dots = a_i \frac{r^{(k)}}{a_k} \quad [14]$$

Esta relación indica que la velocidad de reacción total se puede determinar siguiendo la velocidad de aparición o desaparición del componente que sea más fácilmente detectable, aunque no sea el de mayor interés. Un ejemplo de relevancia microbiológica es la oxidación microbiana de la glucosa:



El desarrollo de esta reacción puede seguirse midiendo la concentración de cualquiera de los reaccionantes o productos. Sin embargo, el oxígeno puede medirse de forma fácil y segura, siendo utilizado para determinar las velocidades de reacciones microbianas aerobias. De la Ec. 1 se ve que la relación molar entre las velocidades de eliminación de glucosa y oxígeno es aproximadamente de 0.4, ya que según la Ec. 14:

$$r^{\text{glucosa}} = \frac{1}{2.5} r^{\text{O}_2} = 0.4 r^{\text{O}_2}$$

Así, conociendo la expresión que representa la cinética general de una reacción, el consumo o producción de una sustancia o componente de la reacción puede calcularse fácilmente mediante las relaciones estequiométricas entre los componentes. Por ejemplo si r^{glucosa} significa que 1 mol de glucosa se consume en la unidad de tiempo, la ratio 2.5 moles O₂/mol de glucosa multiplicada por r^{glucosa} dará como resultado que en esa misma unidad de tiempo se consumen 2.5 moles de oxígeno.

7.- FUNDAMENTOS CINÉTICOS

La velocidad de reacción se expresa mediante una ecuación cinética, que generalmente es el resultado de un ajuste de datos empíricos. Los valores de los coeficientes deben encontrarse mediante experimentación, aún cuando la forma de la ecuación cinética se pueda deducir de un análisis teórico o modelo mecanicista. La determinación de una ecuación cinética útil, usualmente requiere un estudio para determinar la influencia de la concentración, continuando con la del pH, temperatura, etc., sobre los coeficientes cinéticos.

La ecuación cinética

El orden n-ésimo de reacción se ha empleado con gran éxito en la teoría del reactor químico (Levenspiel, 1972). La ecuación es un modelo descriptivo, de dos parámetros, y es de utilidad para un amplio rango de datos experimentales:

$$r = kC^n \quad [15]$$

donde: k = coeficiente cinético ($t^{-1}M^{1-n}L^{3(n-1)}$)

n = orden de reacción

La ecuación es útil gracias al escaso número de parámetros y a su simplicidad cuando se emplea en balances de materia. Otra forma de ecuación cinética, usada ampliamente en los reactores microbianos, es la *ecuación cinética de saturación (tipo Monod)*:

$$r_c = \frac{k_1 C}{k_2 + C} \quad [16]$$

donde: k_1 = coeficiente cinético ($ML^{-3}t^{-1}$)

k_2 = coeficiente de saturación (ML^{-3})

Lo más importante desde un punto de vista práctico, son los valores numéricos de los coeficientes cinéticos, que dependerán de las unidades de medición. Por ejemplo, la velocidad de eliminación de la glucosa en un reactor microbiano puede describirse con la Ec. 16 en la cual C puede expresarse bien como concentración de glucosa o de carbono. Cuando la concentración de carbono es la variable, k_1 y k_2 serán un 40 % de los valores que se obtendrían si se midiera glucosa, ya que la glucosa tiene un 40 % de carbono en peso. Una confusión similar puede darse cuando unidades de concentración molar son comparadas con unidades de concentración másica. Las unidades molares son complicadas en sistemas biológicos, pues, la masa celular microbiana no puede ser fácilmente caracterizada mediante un "peso molecular".

Formas de expresar las cinéticas

Los procesos cinéticos son convenientemente expresados mediante magnitudes intensivas: independientes de la masa del sistema, de modo que los resultados pueden emplearse para analizar sistemas de diferente tamaño y composición. Así la velocidad de reacción observada del proceso, r , puede expresarse por unidad de volumen del reactor:

$$r = R/V \quad [17]$$

Donde: V = volumen del reactor (L^3)

R = flujo transformado o eliminado (Mt^{-1})

r = velocidad de reacción por unidad de volumen del reactor ($ML^{-3}t^{-1}$)

La velocidad de conversión puede basarse también en la unidad de biomasa, y en ese caso es llamada velocidad específica de reacción:

$$r_x = R/X \quad [18]$$

Donde:

X = biomasa (M_x)

r_x = velocidad de reacción por unidad de biomasa (MM_x^{-1} o posiblemente t^{-1})

Para sistemas heterogéneos como los biopelícula, el área superficial de reacción puede ser una base para expresar la cinética:

$$r'' = R/A \quad [19]$$

Donde:

A = área superficial reactiva (L^2)

r'' = velocidad de reacción por unidad de superficie ($ML^{-2}t^{-1}$)

Diferencias entre reacciones microbianas y químicas

Los métodos para determinar los parámetros estequiométricos y cinéticos para una conversión microbiana dada provienen de su aplicación a reacciones abióticas. Las conversiones bioquímicas intermediadas por organismos vivos difieren de las químicas abióticas en varias formas:

- 1.- Las reacciones microbianas son generalmente irreversibles. El punto final estequiométrico generalmente refiere el agotamiento de uno de los reaccionantes. Así, el estado de equilibrio es algo trivial desde el punto de vista microbiano.
- 2.- Todas las reacciones microbianas son heterogéneas, requieren al menos dos fases (células microbianas "sólidas" y agua).
- 3.- Las bajas concentraciones de reaccionantes y productos, además de la característica heterogénea, incrementan potencialmente las limitaciones a la transferencia de materia.

- 4.- La reacción, aunque frecuentemente representada por una ecuación estequiométrica, consiste sólo de reacciones enzimáticas que ocurren en la región del metabolismo de la célula.
- 5.- Las reacciones son generalmente autocatalíticas: la biomasa y las enzimas relacionadas incrementan según la reacción sucede.
- 6.- Uno de los reaccionantes, la biomasa, tiene una estructura que puede influenciar la estequiometría y cinética de la reacción.

BIBLIOGRAFÍA

- Characklis W. G. (1990). “Energetics and stoichiometry”. En *Biofilms*, Edit. John Wiley and Sons, Inc. New York. ISBN: 0-471-82663-4.
- Eckenfelder, W. W. and Musterman, J. L. (1992). “Activated sludge treatment of industrial waters”. En *Activated sludge process design and control: theory and practice*. © Technomic Publishing Company, Inc., Pennsylvania. ISBN: 87762-889-0.
- Henze, M.; Grady, C. P. L.; Gujer, W.; Marais, G. v. R. ; and Matsuo T. (1987). “Activated Sludge Model 1”. IAWPRC Sci. and Tech. Report N° 1, IAWPRC, London.
- McCarty, Perry L. (1975). “Stoichiometry of biological reactions”. *Progress in Water Technology*, vol. 7 (1): 157 – 172.
- Orhon D., and Artan, N. (1994). “Energetics of Microbial Processes”. En *Modelling of activated sludge systems*. Edit. Technomic Publishing Company, Inc. Pensilvania. ISBN: 1-56676-101-8.



Rittmann, B. E., and McCarty, P.L. (2001). “Biotecnología del Medio Ambiente”. McGraw-Hill Interamericana de España, Madrid. ISBN: 84-481-3280-7.

Sawyer, C. N., McCarty, P. L. and Parkin, G. F. (2001). “Química para Ingeniería Ambiental”. McGraw-Hill Interamericana, Bogotá. ISBN: 958-41-0164-1.

APÉNDICE I. MÉTODO TERMODINÁMICO PARA ESTIMAR f_s (TOMADO DE McCARTY, 1975)

McCarty (1975) desarrolló un método termodinámico para evaluar la fracción de eq-e⁻ del dador de electrones (sustrato) que se emplean en la síntesis celular. Este método establece como base de cálculo 1 eq-e⁻ como unidad de biomasa y de sustrato, e involucra la estequiometría del dador y aceptor de electrones, la energía libre liberada por unidad de electrón transferido, las diferentes vías bioquímicas responsables de la transferencia de electrones, y la utilización de energía con su correspondiente eficiencia de transferencia. El método se sustenta en el siguiente balance energético:

$$(1-fs) k_e \Delta G_r + fs \Delta G_s = 0 \quad [I.1]$$

Donde:

ΔG_s = energía libre requerida para la síntesis de 1 eq-e⁻ de biomasa

ΔG_r = energía libre liberada por la oxidación de 1 eq-e⁻ de sustrato

k_e = eficiencia de transferencia de energía libre

fs = fracción eq-e⁻ de sustrato utilizada en biosíntesis

Dividiendo la Ec. I.1 entre fs , y definiendo A como:

$$A = \frac{\text{eq-e}^- \text{ de sustrato gastados para energía}}{\text{eq-e}^- \text{ de células sintetizadas}} = \frac{1-fs}{fs}$$

La expresión del balance fundamental de energía (Ec. I.1) queda:

$$k_e A \Delta G_r + \Delta G_s = 0 \quad [I.2]$$

De la cual:

$$A = -\frac{\Delta G_s}{k_e \Delta G_r} \quad [I.3]$$

Además:

$$fs = \frac{1}{1+A} \quad [I.4]$$

La energía requerida para síntesis, ΔG_s , depende principalmente del nivel energético de la fuente de carbono. McCarty asoció tres intervalos diferentes de energía para la conversión de la fuente de carbono a biomasa, definidas mediante la siguiente expresión:

$$\Delta G_s = \frac{\Delta G_p}{k_e^m} + \frac{\Delta G_n}{k_e} + \Delta G_c \quad [I.5]$$

Un esquema de estos intervalos se muestra en la Fig. II.1:

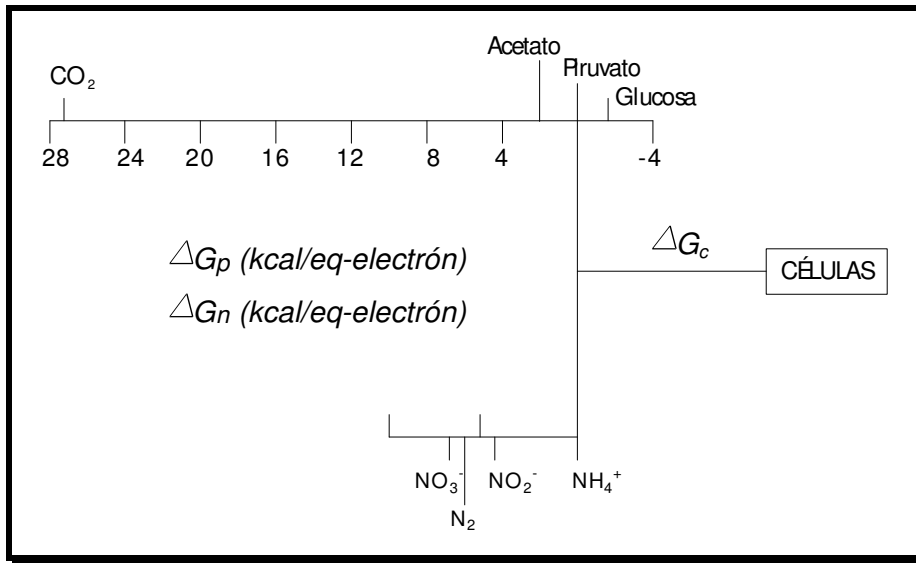


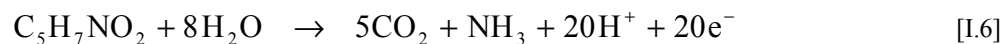
Figura II.1.- Requerimientos energéticos para biosíntesis a partir de varias fuentes de carbono y nitrógeno. (McCarty, 1971).

ΔG_p denota la energía para la conversión de la fuente de carbono en piruvato, un producto metabólico intermedio. Puede ser un intervalo de demanda energética ($\Delta G_p > 0$; $m = +1$) o de liberación de energía ($\Delta G_p < 0$; $m = -1$) como en el caso de la glucosa.

ΔG_n define la energía que podría requerirse para reducir nitrato o nitrito a amonio, en el caso que estos compuestos fueran la fuente de nitrógeno para la biosíntesis. Los valores informados de ΔG_n son de 3.25 kcal/eq-e⁻ biomasa y 4.17 kcal/eq-e⁻ biomasa para reducir nitrito y nitrato, respectivamente.

Finalmente, ΔG_c es la energía gastada para producir biomasa a partir de piruvato y amonio. McCarty calculó para ΔG_c un valor de 7.5 kcal/eq-e⁻ biomasa, con las siguientes suposiciones:

- (1) 10,5 g de biomasa sintetizada por mol de energía del ATP
- (2) 12,5 kcal de energía liberada por mol de ATP, bajo condiciones fisiológicas
- (3) Un 90% de contenido orgánico en la biomasa
- (4) 113 g de biomasa (1 mol) es equivalente a 20 e⁻, de acuerdo con la siguiente semi reacción:



Para el crecimiento heterotrofo McCarty (1975) publicó que la eficiencia de transferencia de energía libre, k_e , puede variar en un rango de 0.4 - 0.8, y sugirió como valor medio consistente $k_e = 0.6$. La Tabla 1.3 muestra una lista comparativa de valores de producción heterotrofa experimentales y teóricos, éstos calculados sobre la base de las semi-reacciones presentadas en la Tabla 1 y con $k_e = 0.6$, para varios dadores y aceptores de electrones.

Tabla I.1.- Valores de Y_H , experimentales y teóricos, de crecimiento heterotrófico (Fuente: McCarty, 1975)

Dador de e^-	Aceptor de e^-	Y_H (eq- e^- biomasa/eq- e^- sustrato)	
		Experimental	Calculado ($k_e = 0.6$)
Glucosa	O ₂	0.79	0.72
Fructosa	O ₂	0.74	0.72
Lactosa	O ₂	0.74	0.72
Sucrosa	O ₂	0.75	0.72
Glicina	O ₂	0.52	0.64
Alanina	O ₂	0.52	0.64
Glutamato	O ₂	0.55	0.64
Benzoato	O ₂	0.46	0.60
Propionato	O ₂	0.58	0.59
Acetato	O ₂	0.58	0.59
Metanol	NO ₃ ⁻	0.36	0.67
Octanoato	CO ₂	0.069	0.052
Metanol	CO ₂	0.15	0.21
Benzoato	CO ₂	0.11	0.062
Propionato	CO ₂	0.069	0.048
Acetato	CO ₂	0.06	0.047
Glucosa	CO ₂	0.27	0.28

En el caso del crecimiento nitrificante autotrofo la eficiencia en la utilización de la energía se reduce a un 14 % (Orhon y Artan, 1994).

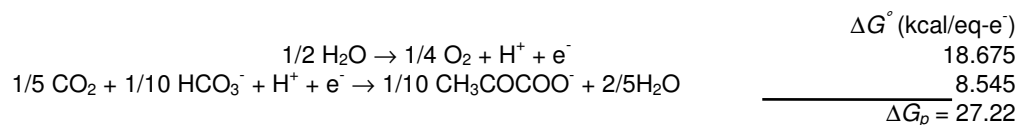
Aplicando el método de McCarty, con los datos de la Tabla 1, se puede estimar el coeficiente de producción celular de nitrificación Y_A (Ejemplo 1A de Orhon, 1994):

Cálculo de Y_A a partir de un balance de energía

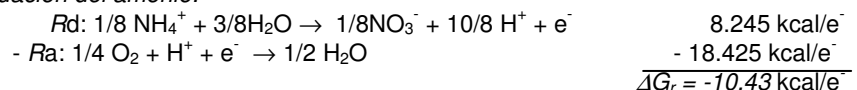
La energía requerida para síntesis, ΔG_s quedó definida como:

$$\Delta G_s = \frac{\Delta G_p}{k_e^m} + \frac{\Delta G_n}{k_e} + \Delta G_c$$

La energía requerida para la síntesis de las nitrificantes es considerablemente mayor que la necesaria para el crecimiento heterotrofo, principalmente por la reducción del CO₂ al nivel de oxidación del piruvato. De la Tabla 1:



La energía liberada, ΔG_r , de la oxidación del amonio:



$m = +1$ (ya que $\Delta G_p > 0$)

$\Delta G_n = 0$, ya que el amoníaco es usado para la biosíntesis

$\Delta G_c = 7.5 \text{ kcal}/\text{eq-}e^-$, como ya se estableció previamente

Para $k_e = 0.6$, $\rightarrow \Delta G_s = 27.22/0.6 + 7.5 = 52.87 \text{ kcal}/\text{eq-}e^-$

Entonces:

$$A = -\frac{\Delta G_s}{k_e \Delta G_r} = \frac{52.87}{0.6 \times 10.43} = 8.45$$

De la Ec. 1.4:

$$Y_A = \frac{1}{1+A} = \frac{1}{1+8.45} = 0.106 \text{ eq-e}^- \text{ cél/eq-e}^- \text{ N}$$

En realidad, expresado en eq-e- cél/eq-e- N, se trata de fs. Re-calculando con 1.75 g N/eq-e⁻N, 5.65 g SSV cél/eq-e⁻ celular y 8 g DQO cél/eq-e⁻ cél., Y_A puede ser calculado en términos másicos:

$$Y_A = 0.106 \times 5.65/1.75 = 0.34 \text{ g SSV/g N}$$

$$Y_A = 0.106 \times 8.0/1.75 = 0.48 \text{ g DQO cél/g N} \Rightarrow 1 \text{ eq-e}^- \text{ cél/eq-e}^- \text{ N} = 4.57 \text{ g DQO cél/g N}$$

El valor teórico de 0.34 g SSV/g N es muy elevado comparado con los valores observados experimentalmente. Esto se debe a que fue calculado para una eficiencia de utilización de la energía del 60 %, que es mucho más alta que la aceptada usualmente para nitrificación. Un 14 % es un valor más representativo de la eficiencia de la transferencia de energía del proceso (Orhon y Artan, 1994). También, hay que señalar que esta eficiencia varía con la edad del cultivo, siendo más alta en cultivos jóvenes que en viejos. Se han informado valores de Y_A en un rango de 0.07 a 0.28 g DQO cél/g N (Henze et al., 1987). La reacción energética muestra que por cada gramo de nitrógeno usado como dador de electrones se demanda 4.57 g de O₂. Por otro lado, la estequiometría global de la nitrificación (síntesis + energía) se basa en la observación de que 4.33 g de O₂ son consumidos por cada g N-NO₃⁻ formado. Por lo tanto, los eq-O₂ de generación de biomasa se calculan mediante:

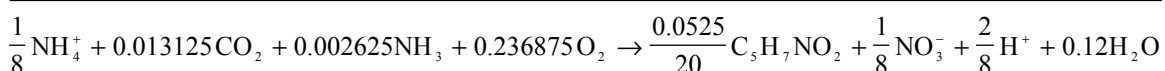
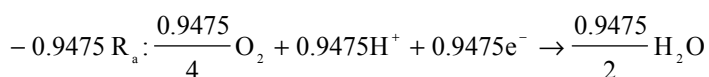
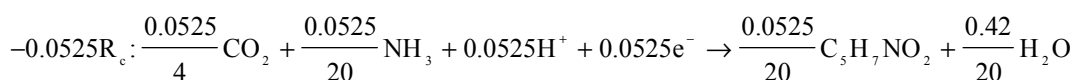
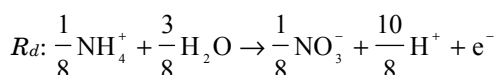
$$4.57 - 4.33 = 0.24 \text{ g O}_2/\text{g N}$$

Esto corresponde a un Y_A observado de 0.24 g DQO cél/g N (Y_A = 0.0525 eq-e⁻ cél/eq-e⁻ N), valor que es aceptado como la producción autotrofa global que caracteriza la nitrificación (Henze et al., 1987). La estequiometría derivada a partir de este valor de producción (Y_A = 0.0525 eq-e⁻ cél/eq-e⁻ N) se presenta en el apéndice II.

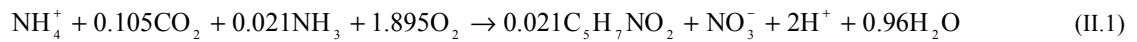
APÉNDICE II. ESTEQUIOMETRÍA OBSERVADA DE LA NITRIFICACIÓN

Desarrollo de la estequiometría global que caracteriza la nitrificación para Y_A = 0.0525 eq-e⁻ cél/eq-e⁻ N:

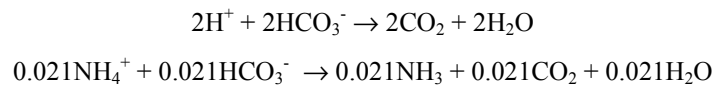
$$R_o = R_d - Y_{NA}R_c - (1 - Y_{NA})R_a$$



Normalizando la Ec. anterior para 1 mol de NH_4^+ :



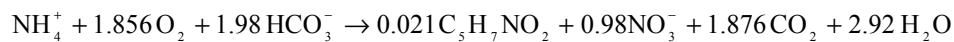
El consumo de alcalinidad debido a la liberación de protones y al amoníaco usado como fuente de nitrógeno en la biosíntesis:



La ecuación estequiométrica corregida por el consumo de alcalinidad queda:



La ecuación II.2 puede ser normalizada para 1 mol de amonio:



La ecuación global predice que 1.98 moles de HCO_3^- serán consumidas por mol de N-NH_4^+ . Esto es equivalente a una reducción de la alcalinidad de 7.07 g $\text{CaCO}_3/\text{g N-NH}_4^+$. El consumo de alcalinidad es un factor importante en el diseño de los procesos de nitrificación.