

# UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA



# ACTIVIDAD DE LAS PROTEASAS BACTERIANAS EN SISTEMAS DE DEPURACIÓN BIOLÓGICOS

MEMORIA que para optar al Grado de Doctor en Ciencias Químicas presenta:

JULIÁN GARCÍA GONZÁLEZ



**MADRID**, 1996

El presente trabajo de investigación ha sido realizado en el Departamente de Ingeniería Química de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección de los Profesores Dr. D. Federico López Mateos y Dr. D. Fernando Mirada Coronel, a quienes deseo expresar mi más profundo y sincero agradecimiento por los consejos que me han brindado a lo largo de todo el trabajo, pero especialmente en la discusión e interpretación de resultados y en la corrección crítica de esta memoria.

Así mismo, mi sincero agradecimiento a D. Felipe Sanchez Manzano y a Dña. Almudena Mier Prieto por su inestimable colaboración en la fase experimental de este trabajo. Mi gratitud también para Dña. Sara Fernandez Martín, D. Alberto Cabrero Martín y D. Jose Carlos Gomez Rivas por su ayuda en el mantenimiento de la Plata Piloto de Lodos Activados.

Finalmente, mi agradecimiento a los responsables de la EDAR de "La China" por las facilidades concedidas para la recogida de los lodos empleados como incóculo de la Planta Piloto, y a todas aquellas personas que de una u otra forma me han prestado su apoyo en el mantenimiento con posterioridad de la misma.

Y como no, de forma especial deseo expresar mi más sincero agradecimiento a Marga, por haber soportado mis cambios de humor durante todo este tiempo y haberme animado y alentado en todo momento.

A Warga, por su constante e incondicional apoyo.

# INDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
II. PARTE TEÓRICA	6
II.1. La actividad microbiana en los lodos activados	7
II.2. El proceso de lodos activos	17
II.2.1. Descripción del proceso	17
II.2.2. Mecanismo de la oxidación biológica aerobia	19
II.2.3. Microbiología del proceso de lodos activados	22
II.2.4. Factores determinantes del desarrollo bacteriano	25
II.2.5. Características de los lodos activados	29
II.2.6. Parámetros de operación del proceso	33
II.3. Enzimas: cinética e inhibición	36
II.3.1. Los enzimas en el metabolismo celular	36
II.3.2. Cinética de las reacciones enzimáticas	38
II.3.3. Efecto del pH sobre la actividad enzimática	45
II.3.4. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática	47
II.3.5. Inhibición de los enzimas	48
III. PARTE EXPERIMENTAL	54
III.1. Objetivo y programa experimental	55
III.2. Materiales	57
III.2.1. Lodo activado	57
III.2.2. Sustrato de hidrólisis	57
III.3. Equipo experimental	59
III.3.1. Planta piloto de tratamiento de aguas residuales	59
III.3.2. Sistema de reactores en discontinuo	63
III.4. Determinaciones analíticas	65
III.4.1. Concentración de biomasa	65
III.4.2. Actividad enzimática de las proteasas. Método del TNBS	69

III.5. Procedimiento experimental	76
III.6. Resultados experimentales	79
III.6.1. Selección del sustrato y de su nivel de saturación	79
III.6.2. Efectos del pH y de la temperatura	85
III.6.3. Efecto de la edad del lodo	115
III.6.4. Efectos de los iones metálicos Cu(II) y Zn(II)	140
IV. INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	208
IV.1. Selección del sustrato y de su nivel de saturación	209
IV.2. Influencia del pH y de la temperatura	215
IV.3. Influencia de la edad del lodo	220
IV.4. Reproducibilidad de los experimentos	225
IV.5. Influencia de los iones metálicos Cu(II) y Zn(II)	229
V. CONCLUSIONES	239
VI. BIBLIOGRAFÍA	242

El proceso de lodos activados es el sistema de tratamiento biológico más utilizado para la biodegradación de la materia orgánica presente en aguas residuales, tanto urbanas como industriales. Surgió a principios de siglo al observarse que cualquier agua residual sometida a aeración durante un período de tiempo suficiente reducía su contenido en materia orgánica, formándose a la vez un lodo floculento.

El examen microscópico del lodo revela que está formado por una población heterogénea de microorganismos que cambian continuamente en función de las variaciones del caudal, composición de las aguas residuales y de las condiciones ambientales. De entre todos los grupos de microorganismos que constituyen el lodo activado, el de las bacterias es el más importante ya que ellas son, verdaderamente, las causantes de la asimilación y degradación oxidativa de la materia orgánica contaminante. Es evidente, en consecuencia, que la eficacia del sistema depende del mantenimiento de la actividad de estos microorganismos, por lo que es necesario disponer de métodos precisos, a la vez que rápidos, para determinar su actividad y, por tanto, la de los lodos activados que, lógicamente, tendrá una relación directa con la eficacia de biodegradación del sistema.

Los métodos actualmente disponibles se basan en la determinación de la velocidad de asimilación de oxígeno por los microorganismos, en la concentración de adenosín trifosfato en los mismos o en la actividad de diversas enzimas claves para el metabolismo celular. Los dos primeros, aunque sirven como indicadores del grado de actividad del proceso de lodos activados, presentan el inconveniente de ser lentos y tediosos, a la vez que necesitan de complejos y costosos equipos para la consecución de sus fines.

Por ello, en los últimos años se vienen desarrollando métodos basados en la determinación de la actividad de ciertos enzimas fundamentales en la asimilación y degradación oxidativa del sustrato: Presentan la ventaja de ser rápidos, sencillos y económicos en su operación, lo que facilita la realización de múltiples ensayos simultáneos para estudiar el comportamiento del lodo en diferentes regímenes de funcionamiento o en presencia de ciertos elementos considerados como tóxicos, lo que permitirá profundizar

en el conocimiento científico y técnico del proceso para adoptar las medidas que, en cada caso concreto, produzcan las máximas eficacias de depuración.

Conocido que el proceso de oxidación del sustrato por el lodo activado es catalizado por determinados enzimas, las deshidrogenasas, se pensó que la determinación de su actividad podía ser una medida directa de la del propio lodo. Por ello, se realizaron una serie de experimentos basados en el proceso de reducción de ciertos indicadores redox que llegan a sustituir la función del oxígeno como portador de electrones en las células vivas.

Ahora bien, para que la materia orgánica sea oxidada por el metabolismo celular sus componentes deben ser compuestos de bajo peso molecular, que faciliten su penetración en la célula a través de la membrana citoplasmática, de forma directa o ayudados por sistemas enzimáticos, donde tiene lugar la oxidación de la materia orgánica.

Sin embargo, una importante fracción de la materia orgánica de las aguas residuales se compone de macromoléculas en disolución y en suspensión coloidal así como de partículas en suspensión, por lo que deben ser reducidas de tamaño por exoenzimas, conocidas genéricamente como hidrolasas, producidas por las propias células. Este proceso de hidrólisis es mucho más lento que el de oxidación de la materia orgánica, por lo que constituye la etapa controlante en su asimilación y degradación en los procesos de lodos activados. De aquí, que la actividad de estos enzimas constituya en la actualidad motivo de especial atención por ser índice para determinar la actividad de los lodos activados.

En esta línea de investigación, la actividad de los enzimas hidrolíticos que participan en la degradación de la materia orgánica se determina a través de la conversión específica de ciertos sustratos sintéticos que generan productos resistentes al metabolismo celular que pueden ser fácilmente cuantificados por espectrofotometría. El desarrollo y utilización de estos costosos sustratos sintéticos vendría justificado por la imposibilidad aparente de utilizar macromoléculas naturales, pues la cuantificación de sus productos de hidrólisis -aminoácidos en el caso de partir de proteínas, o azúcares al utilizar

carbohidratos- resultaría de todo punto imposible al ser inmediatamente metabolizados por los microorganismos. El seguimiento de la reacción de hidrólisis a través de la velocidad de desaparición del producto tampoco resulta viable al utilizarse concentraciones iniciales de sustrato elevadas que aseguren la cinética de orden cero; pudiendo producirse, además, la adsorción del sustrato sobre el lodo que, al transcurrir a velocidad más elevada, enmascararía la propia velocidad de hidrólisis.

Sin embargo, si bien es cierto que el seguimiento de las reacciones de hidrólisis de los carbohidratos se realiza mediante la cuantificación de los azúcares reductores que aparecen como productos finales de reacción, y que en los sistemas biológicos son inmediatamente aprovechados como fuente de carbono en las reacciones de oxidación y de síntesis, imposibilitando su determinación para seguir el transcurso de la reacción. También es cierto que la actividad de los enzimas proteolíticos se sigue mediante la valoración de los grupos amino libres generados en la hidrólisis de los enlaces peptídicos de la proteína; por tanto, esta técnica se puede aplicar en los sistemas biológicos pues los péptidos formados inicialmente seguirán en el medio de reacción al no ser aún metabolizados por los microorganismos debido a su elevado peso molecular.

Este comportamiento nos ha animado a desarrollar un nuevo procedimiento para determinar la actividad de las proteasas bacterianas en los procesos de lodos activados basado en la determinación de la velocidad de hidrólisis de una proteína natural.

En este trabajo se recoge la investigación realizada utilizando gelatina como sustrato de las proteasas bacterianas de dos lodos activados, de edades diferentes, generados en una planta piloto de tratamiento de aguas residuales, en distintas condiciones ambientales (pH y temperatura) y en presencia de dos tóxicos potenciales del proceso, como son los iones metálicos Cu(II) y Zn(II), independientes y conjuntamente, a distintas concentraciones.

La experimentación se ha desarrollado en las condiciones en que los enzimas se hallan saturados de sustrato, de forma que la velocidad de hidrólisis es, únicamente, proporcional a la concentración de enzima activa. Así, la velocidad máxima de hidrólisis se determina a partir del incremento de la concentración de grupos amino libres en la suspensión de lodo activado con el tiempo. Seguidamente, se calcula la velocidad máxima específica de hidrólisis como el cociente entre la velociad máxima y la concentración de biomasa en el ensayo. Así es posible evaluar la incidencia de las condiciones de operación y la presencia de los iones de metales pesados en el sistema sobre la actividad del lodo activado a partir de las variaciones de la velocidad máxima específica de hidrólisis de la gelatina.

#### II.1. LA ACTIVIDAD MICROBIANA EN LOS LODOS ACTIVADOS.

La eliminación de la materia orgánica por oxidación biológica en los sistemas de depuración de aguas residuales por lodos activados depende de la actividad de una mezcla de poblaciones de microorganismos heterótrofos. Por ello, para controlar estos procesos es indispensable reconocer los factores que regulan la actividad biológica de los microorganismos, disponiendo métodos rápidos y efectivos para la determinación de la actividad microbiana en los lodos activados.

En este campo, ha sido enorme el esfuerzo realizado en la investigación de métodos fiables, a la vez que sencillos, para determinar la actividad de los lodos activados. Destacan por su simplicidad los que se basan en la medida de los sólidos en suspensión totales (SST) o en la de los sólidos en suspensión volátiles (SSV) en el tanque de aeración; sin embargo, de esta forma se determina, únicamente, la cantidad total o la fracción volátil de células y de sólidos inertes presentes en el medio, nunca la actividad celular, ya que no se distingue entre células vivas y células muertas.

Numerosos investigadores han intentado cuantificar la masa de células activas utilizando métodos más específicos que los citados. Así, Agardy y col. (1963) llegaron a concluir que la concentración de ácido desoxirribonucleico (ADN) en el medio podría resultar mejor indicador de la actividad de los microorganismos en los sistemas anaerobios que la de los SSV; en cambio, Carlson (1965) demostró que el incremento en el contenido de ADN en un sistema discontinuo de lodos activados no resulta proporcional al incremento en la masa de lodos. Además, Genetelli (1967) comprobó que el contenido en ADN del lodo activado varía con el tipo de microorganismo presente y con la concentración de lodo.

En otra línea diferente de investigación, Gaudy (1963) sugirió que la concentración de *proteínas* del lodo podría ser utilizada como medida de la concentración de microorganismos activos. Posteriormente, Hartmann y Laubenberger (1968) determinaron el contenido en nitrógeno orgánico de los lodos con este objetivo, basándose en anteriores

estudios de Symons y McKinney (1958) en los que habían determinado que el contenido en nitrógeno de los lodos activados puede variar entre el 1,5 y el 9,7%, dependiendo de la disponibilidad de nitrógeno.

Aunque estas técnicas constituyen medidas más específicas del contenido en materia celular que la determinación de los SSV o de los SST, al igual que sucede con éstas, los productos que interesan son parcialmente retenidos por los organismos no activos, lo cual, obviamente, supone un claro inconveniente.

Así, Stanier y col. (1963) afirmaron que la técnica de recuento en placa es el método más sensible para la determinación de células vivas en cultivos microbianos puros, aunque debe aplicarse con precaución en los sistemas de lodos activados. En este caso, la fiabilidad del método depende de la necesaria dispersión del flóculo biológico que debe llevarse a cabo antes del recuento. Además, la selección del medio de cultivo que soporte la variedad de especies presentes en el lodo activado entraña numerosos problemas.

Lo expuesto justifica que para este tipo de sistemas biológicos se sigan desarrollando métodos de evaluación de la actividad microbiana. En este sentido, que el adenosín trifosfato (ATP) sea un constituyente celular, al parecer no conservativo, y que se encuentre presente en cantidades prácticamente constantes en las células microbianas activas de diferentes especies y en diferentes etapas de su crecimiento, llevó a Hamilton y Holm-Hansen (1967), empleando el método de Holm-Hansen y Booth (1966), a determinar que el contenido en ATP de siete especies de bacterias permanecía prácticamente constante (0,5-6,5·10<sup>-9</sup> µg ATP/célula) y que además no se conservaba en células muertas. A raíz de ello, Patterson y col. (1969) propusieron la determinación del nivel de ATP en los lodos activados como un índice de la concentración de microorganismos activos. Desde entonces muchos investigadores han utilizado esta técnica para determinar la actividad de los microorganismos presentes en los sistemas de lodos activados (Chiu y col., 1973; Kees y col., 1975; Roe y Bhagart, 1982; Van Esbroeck, 1984; Neethling, J.B.; 1985; Gikas y Livingston, 1993).

Por otra parte, en los sistemas aerobios, como es el caso de los procesos de lodos activados, la eliminación del sustrato viene acompañada por la oxidación biológica del mismo, siendo el aceptor final de electrones el oxígeno disuelto (OD) en el medio. Por ello, la velocidad de asimilación de OD por los microorganismos ha sido utilizada por gran cantidad de investigadores como medida para la determinación de la actividad del lodo activado (Khararjian, 1980; Madden y Tittlebaum, 1984; Huang y Cheng, 1984; Huang y col, 1985; Suschka y Ferreira, 1986; Chandra y col, 1987; Spanjers y Klapwik, 1991; Wong y Smith, 1992; Spanjers y Olsson, 1992).

Como el proceso de transferencia de electrones desde el sustrato al oxígeno resulta catalizado por unas enzimas, conocidas como deshidrogenasas, su actividad se puede emplear para determinar la del lodo activado. Para ello se utilizan algunos indicadores redox que pueden actuar como portadores de electrones en las células vivas, sustituyendo así la función del oxígeno. Los indicadores redox que han resultado útiles para la medida de la actividad de las deshidrogenasas en los lodos activados han sido el cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (CTT), el cloruro de 2-(p-iodofenil)-3-(p-nitrofenil)-5-fenil tetrazolio (INT) y el azul de metileno.

El método para determinar la actividad de las deshidrogenasas utilizando CTT fué descrito por primera vez por Bucksteeg y Thiele (1959), y con posterioridad empleado en diversos trabajos de investigación para medir la actividad de los lodos activados (Lenhard y col., 1964; Bucksteeg, 1966; Ford y col., 1966; Patterson y col., 1969; Jones y Prasad, 1969). En este método, cuya reacción se presenta en la figura 2.1, la oxidación del sustrato viene acompañada por la reducción del CTT a 1,3,5-trifeniltetrazolio formazano. Klapwijk y col. (1974) realizaron una detallada discusión de este método.

Figura 2.1. Reducción del cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio.

Sin embargo, en un estudio posterior realizado por Ryssov-Nielsen (1975) se concluye que el ensayo del CTT, en los términos descritos por Klapwijk y col., no resulta un método apropiado para el estudio de los efectos de ciertos tóxicos sobre los lodos activos, y se propone una modificación del mismo para subsanar esta deficiencia.

Otro indicador redox derivado del CTT, el cloruro de 2-(p-iodofenil)-3-(p-nitrofenil)-5-fenil tetrazolio (INT), posee propiedades más favorables para la determinación de la actividad de los microorganismos en medios que pudieran resultar tóxicos. Entre estas propiedades cabe destacar su mayor afinidad por los electrones (Anderson y col.,1988) y la posibilidad de ser utilizado en condiciones de nitrificación-desnitrificación (DeSha y Dozier, 1979)

Basándose en este indicador Bitton y Koopman (1982) desarrollaron un método para determinar la actividad fisiológica de los microorganismos filamentosos en los lodos activados. La actividad de las deshidrogenasas se determinó por extracción del INT-formazano (INTF) y por recuento microscópico de los cristales de INTF que aparecen en forma de cristales rojos, claramente visibles al microscopio, en el interior del citoplasma celular. Así, el recuento microscópico de los cristales rojos de INTF dentro del citoplasma de los microorganismos, y su expresión como un porcentaje de longitud de microorganismos filamentosos activos a longitud total de microorganismos filamentosos presentes en la muestra de células, permite la determinación de la actividad específica de

los microorganismos filamentosos en los flóculos de lodos activados. A su vez, la determinación del INTF por espectrofotometría, una vez extraído del citoplasma celular, constituye una medida de la actividad total de los lodos activados.

Este método fué aplicado con éxito por Logue y col. (1983) para controlar el efecto del cloro en la actividad de las bacterias filamentosas en un sistema de lodos activados a escala de laboratorio y, de esta forma, determinar la concentración de cloro que inhibía la aparición de dichos microorganismos. Análogamente, Kim y col. utilizaron este método en el estudio del proceso de inhibición causado por el cloro y el peróxido de hidrógeno en tres tipos de microorganismos filamentosos (1987) así como en cultivos de filamentosos puros y en lodos activados (1994).

Por otra parte, el método para determinar la actividad de las deshidrogenasas presentes en los lodos activados por reducción del azul de metileno fué propuesto por Halász (1972). En este caso, la actividad de las deshidrogenasas viene expresada en función de la concentración de azul de metileno que no ha sido reducido a su forma leuco (Figura 2.2), y que permanece en disolución, fuera del citoplasma celular, por lo que este método resulta más sencillo de operación que el de las sales de tetrazolio.

Figura 2.2. Reducción del azul de metileno.

Jørgensen (1984) indicó que la forma leuco del azul de metileno puede ser oxidada por el oxígeno y, por tanto, no se produce la decoloración a menos que se elimine el oxígeno en disolución de la muestra. Por ello, propuso la modificación del método original de Halász en la que se realiza la desorción previa del oxígeno disuelto en la muestra antes de añadir el azul de metileno sobre el lodo.

Como el proceso de oxidación biológica, catalizado por las deshidrogenasas, transcurre en el interior de las células, la materia orgánica debe estar en forma de moléculas sencillas que sean capaces de atravesar la pared celular. Sin embargo, los sólidos coloidades y en suspensión contribuyen entre un 60-70% a la carga orgánica de las aguas residuales (Hunter y Heukelekian, 1965; Rickert y Hunter, 1967). Aunque una parte de las partículas orgánicas puede ser eliminada en los clarificadores primarios, su concentración en el influente de los sistemas biológicos es aún de un 40-50% de la concentración total de orgánicos (Levine, 1991). Así, para utilizar estas partículas como sustrato, las bacterias disponen de enzimas extracelulares -hidrolasas- que rompen y solubilizan esta materia, siendo la hidrólisis mucho más lenta que la oxidación del sustrato soluble. Por tanto, será la etapa de hidrólisis la que determine la velocidad total de la degradación de las partículas orgánicas (Ubukata, 1992).

Con objeto de cuantificar la actividad de las hidrolasas y determinar la del lodo activado, Teuber y Brodisch (1976, 1977) propusieron una serie de sustratos sintéticos cuya hidrólisis da lugar a productos coloreados, resistentes al metabolismo celular, que se pueden determinar con posterioridad mediante el empleo de técnicas espectrofotométricas. El desarrollo de estos sustratos sintéticos vendría justificado por la imposibilidad de utilizar macromoléculas naturales, pues la cuantificación de los productos de hidrólisis, tales como aminoácidos procedentes de la hidrólisis de proteínas o azúcares de los polisacáridos, no sería posible debido a su inmediata asimilación por el metabolismo celular.

Así, para determinar la actividad de las aminopeptidasas, enzimas que catalizan la hidrólisis de la cadena peptidica de las proteínas, se utiliza como sustrato la L-alanina-4-nitroanilina, cuya hidrólisis da lugar a la L-alanina, que será metabolizada por el microorganismo, y a la p-nitroanilina, resistente al metabolismo celular y cuya aparición puede ser cuantificada por espectrofotometría (Figura 2.3).

Figura 2.3. Hidrólisis de la L-alanina-4-nitroanilina.

De forma análoga, para determinar la actividad de las glucosidasas, enzimas que catalizan la hidrólisis de los disacáridos, se utiliza como sustrato el 4-nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranósido (Figura 2.4).

Figura 2.4. Hidrólisis del 4-Nitrofenil-α-D-glucopiranósido.

Con posterioridad, Swisher y Carroll (1980) propusieron un método para estimar la actividad de la biomasa microbiana basado en la determinación espectrofotométrica de la hidrólisis del diacetato de fluoresceína (DAF) (Figura 2.5).

Figura 2.5. Hidrólisis del Diacetato de fluoresceína.

Aunque la determinación de la actividad de las esterasas a través de la hidrólisis de DAF no aporta ninguna información sobre la degradación de sustancias específicas, se ha considerado como una medida de la actividad heterótrofa general, principalmente en suelos (Schnürer y Roswall, 1982; Schnürer y col., 1985; Federle y col., 1986), ya que se han obtenido correlaciones aceptables con la concentración de biomasa.

Recientemente, Jørgensen y col. (1992-a) comprobaron que este método no es aplicable para la determinación de la actividad en lodos activados. Conclusión basada en el hecho de que la concentración de biomasa activa estimada por el método de hidrólisis del DAF sería superior a la de sólidos en suspensión, y que no se correlaciona con el contenido de ATP y la velocidad de asimilación de oxígeno por los lodos activados. En otro trabajo, Jørgensen y col. (1992-b) concluyen diciendo que la actividad del DAF no puede ser aplicada para la medida de la concentración de biomasa activa en medios en los que cambien las condiciones fisiológicas.

Por el importantísimo papel de los sistemas enzimáticos en la hidrólisis y mineralización de los residuos orgánicos, los ensayos enzimáticos se han venido empleando para caracterizar la actividad metabólica de los microorganismos presentes en los lodos activados, para posteriormente relacionarla con la eficacia de eliminación de los influentes residuales en diferentes regímenes de funcionamiento y en presencia de compuestos tóxicos.

En esta línea de investigación, Richards y col. (1984) determinaron la actividad enzimática del lodo activado de 13 plantas de depuración de aguas residuales con diferentes configuraciones y regímenes de operación. El objetivo era determinar la relación entre la actividad enzimática del lodo activado, su composición bioquímica, la velocidad de asimilación de oxígeno y los regímenes de operación de las distintas plantas. La principal conclusión del trabajo fué que los ensayos enzimáticos eran unos inmejorables indicadores de la actividad del lodo, siendo sus principales ventajas: la simplicidad, su bajo coste y el empleo de equipos presentes en la mayoría de los laboratorios.

Posteriormente, Nybroe y col. (1992) determinaron la actividad de la deshidrogenasa, la α-glucosidasa, la alanina-aminopeptidasa y la esterasa de un lodo activado y de un lodo anaerobio, procedentes ambos de una planta piloto. La actividad enzimática observada en estos lodos fué diferente, llegando a la conclusión que las poblaciones microbianas de estos lodos eran diferentes o tenían diferentes propiedades fisiológicas; además, demostraron que la actividad enzimática del lodo activado estaba fuertemente influida por la composición del influente.

Por su parte, Boczar y col. (1992) utilizaron un kit de ensayos formado por una gran variedad de pruebas enzimáticas para estudiar donde están localizadas los enzimas responsables de la hidrólisis del sustrato en los lodos, así como para comparar el rendimiento de éstos frente a diferentes sustratos. No se observó actividad hidrolítica alguna en aquellas fracciones de lodo que habían sido inactivadas, así como tampoco en aquellas fracciones extracelulares de los mismos, lo cual indica que la hidrólisis del sustrato no se produce por la acción de enzimas libres en el medio y que la actividad enzimática es propia de los microorganismos activos. Otra de las conclusiones deducidas de este trabajo fué que las aminopeptidasas son las que presentan mayor actividad frente al resto de enzimas.

Como se ha indicado, los ensayos enzimáticos se han convertido en una alternativa para determinar el impacto de los compuestos tóxicos sobre los sistemas de lodos activados. Es el caso de los metales pesados que se encuentran con relativa frecuencia en

las aguas residuales en concentraciones que pueden tener un impacto adverso sobre los procesos de depuración con lodos activados; por ello, se hace necesario contar con métodos rápidos, sensibles y económicos para determinar su impacto sobre estos sistemas de tratamiento. El parámetro de control más aceptado para determinar la inhibición causada por los metales pesados sobre la actividad del lodo ha sido la velocidad de asimilación de oxígeno; sin embargo, esta medida requiere el empleo de electrodos o sistemas manométricos y equipos de registro relativamente caros, de tal modo que queda limitado el número de muestras que se pueden realizar de forma simultánea. Las técnicas enzimáticas, en cambio, presentan la ventaja de necesitar un material sencillo y barato, con lo cual se pueden replicar gran cantidad de ensayos sin dificultad.

Anderson y col. (1988) estudiaron la inhibición causada por el Cd<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup> y Zn<sup>2+</sup> sobre los lodos activados utilizando el ensayo del INT para determinar la actividad de las deshidrogenasas en presencia del metal. Los resultados experimentales se expresaron como la concentración de metal que disminuía en un 50% la actividad del lodo. Del análisis de los resultados se concluye que el Cu<sup>2+</sup> y el Hg<sup>2+</sup> son los que presentan una mayor inhibición, seguidos del Cd<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> y Ni<sup>2+</sup>. Estos resultados fueron comparados con los obtenidos mediante la determinación de la velocidad de asimilación de oxígeno, encontrándose una buena correlación entre ambos.

El CTT ha sido también utilizado en varios trabajos para determinar la inhibición causada por los metales pesados: Patterson y col (1969) con el Hg<sup>2+</sup>; Brezonik y Patterson (1971) con el Ni<sup>2+</sup>; Klapwijk y col. (1974) con el Zn<sup>2+</sup>; Ryssov-Nielsen (1975) con el Hg<sup>2+</sup> y Zn<sup>2+</sup>; Cenci y Morozzi (1979) con el Cd<sup>2+</sup>, Cu<sup>2-</sup>, Hg<sup>2+</sup> y Zn<sup>2+</sup>; Dutka y col. (1983) con el Cu<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup> y Zn<sup>2+</sup>; Jørgensen (1984) con el Zn<sup>2+</sup>.

Katayama estudió la inhibición causada por el Cu<sup>2+</sup> (1984), así como la originada por el Cd<sup>2+</sup> y el Hg<sup>2+</sup> (1986), sobre la actividad de la β-galactosidasa y las deshidrogenasas de los lodos activados. Las conclusiones de ambos estudios fueron que estos metales provocan una inhibición reverseble no competitiva sobre estos enzimas, siendo el orden de inhibición: Hg>Cu>Cd.

#### II.2. EL PROCESO DE LODOS ACTIVADOS.

# II.2.1. Descripción del proceso

El proceso de lodos activados es el sistema biológico más ampliamente utilizado para el tratamiento de aguas residuales, tanto domésticas como industriales, de carácter orgánico. Fué desarrollado en Inglaterra en 1914 por Andern y Lockett y denominado así al suponer la producción de una masa activa de microorganismos capaz de estabilizar un residuo orgánico por vía aerobia.

Existen diferentes versiones del proceso de lodos activados, lo que se traduce en una gran versatilidad para adaptarse a un amplio espectro de necesidades del tratamiento. Resultan de diferentes combinaciones de formas de operación, regímenes de mezcla, sistemas de aeración y niveles de carga; sin embargo, desde el punto de vista del funcionamiento, las operaciones del tratamiento biológico de aguas residuales mediante el proceso de lodos activados son: una etapa de oxidación biológica, otra de separación y un sistema de recirculación de los lodos.

Un diagrama de bloques del proceso se recoge en la figura 2.6. El residuo orgánico se introduce en el reactor donde se mantiene un cultivo bacteriano aerobio en suspensión. La materia en suspensión y la coloidal se separan de las aguas residuales por adsorción y aglomeración en los flóculos microbianos; esta materia y los nutrientes disueltos se descomponen luego, lentamente, por acción del metabolismo microbiano.

El ambiente aerobio en el reactor se consigue mediante el uso de difusores o aeradores mecánicos que, a su vez, sirven para mantener su contenido en régimen de mezcla completa. Alcanzado el grado de tratamiento que se desea, la masa microbiana floculenta -lodo- se separa del agua residual por sedimentación. El sobrenadante de la separación es el agua residual tratada, virtualmente libre de lodos.

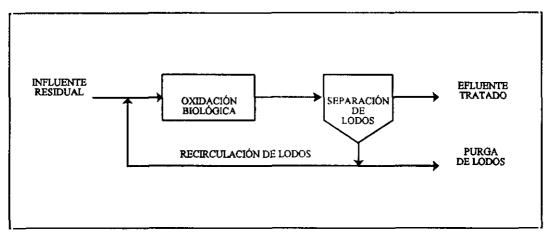


Figura. 2.6. Diagrama de bloques del proceso de lodos activados.

La mayor parte del lodo asentado en la etapa de separación se recircula a la etapa de aeración, para mantener la concentración de los lodos en el tanque de aeración al nivel necesario para un tratamiento efectivo, mientras que el excedente es purgado del sistema. En un sistema estacionario, el lodo purgado representa la cantidad neta de masa microbiana producida por el crecimiento del tejido celular en la etapa de aeración y constituye el "concentrado de contaminación" del sistema.

## II.2.2. Mecanismo de la oxidación biológica aerobia.

El proceso de estabilización de la materia orgánica de las aguas residuales mediante los microorganismos es complejo y difícil: existen numerosas vías y cíclos. Cuando el sustrato o nutriente requerido por la célula no es capaz de penetrar la pared celular, los enzimas extracelulares convierten el sustrato o nutriente de forma que puede ser transportado al interior de la célula, mientras que los enzimas intracelulares catalizan las reacciones de oxidación de la materia orgánica. La energía liberada en estas reacciones es retenida y almacenada en la célula por ciertos compuestos orgánicos, el más frecuente el adenosín trifosfato (ATP) que la utiliza para la síntesis, movilidad y mantenimiento de la célula.

Así pues, el metabolismo de las células bacterianas se realiza mediante reacciones químicas de oxidación y de síntesis, resultado de distintos procesos dentro de la célula, que se desarrollan a través de numerosas reacciones catalizadas por enzimas que oxidan una fracción de la materia orgánica dando lugar a productos finales y liberando la energía necesaria para la síntesis de nuevo tejido celular.

En ausencia de materia orgánica, el tejido celular se asimila por vía endógena para obtener energía que se consume en el propio mantenimiento de las células, originando productos gaseosos finales y materia residual.

En la mayoría de los sistemas de tratamiento biológico estos tres procesos tienen lugar simultáneamente, tal como se refleja en el esquema de la figura 2.7.

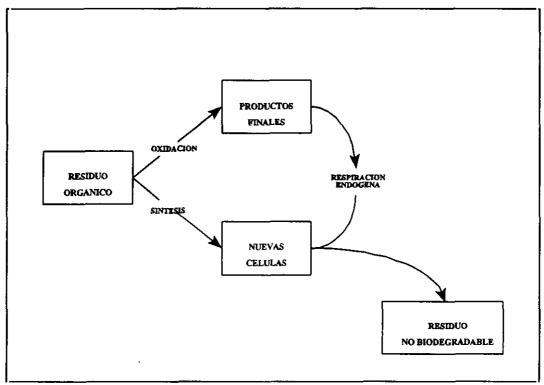


Figura 2.7. Mecanismo de la oxidación biológica aerobia (Eckenfelder, 1980).

Estequiométricamente, los tres procesos pueden representarse como sigue (Metcalf y Eddy, 1985):

Oxidación:

$$COHNS + O_2 + Bacterias - CO_2 + NH_3 + Otros productos finales + Energía$$

Síntesis:

$$COHNS + O_2 + Bacterias + Energía - C_5H_7NO_2$$

Respiración endógena:

$$C_5H_7NO_2 + 5O_2 - 5CO_2 + NH_3 + 2H_2O + Energia$$

En estas ecuaciones, COHNS representa la materia orgánica del agua residual. La fórmula C<sub>5</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>2</sub>, que representa el tejido celular, es un expresión generalizada obtenida experimentalmente, fué propuesta por primera vez por Hoover y Porges en 1952. A pesar de que la reacción de respiración endógena se revela como generadora de productos finales relativamente simples y de energía, también da lugar a productos orgánicos finales estables.

## II.2.3. Microbiología del proceso de lodos activados.

El lodo activado está constituído, esencialmente, por bacterias y protozoos y, a veces, por hongos, rotíferos y nematodos. Para proyectar correctamente un sistema de lodos activados, con garantías de buen funcionamiento, es necesario conocer la función de cada microorganismo dentro del sistema.

Las bacterias son los microorganismos más importantes en el proceso de lodos activados, ya que producen la descomposición de la materia orgánica del influente. En la formación de los lodos activados pueden participar numerosas especies de bacterias (Higgins y Burns, 1975); el género dominante es una consecuencia de los compuestos orgánicos que constituyen la contaminación, así como de las condiciones del medio: pH, temperatura, concentración de oxígeno disuelto, etc.

Si bien las bacterias son los microorganismos que degradan el residuo orgánico, las actividades metabólicas de otros microorganismos son igualmente importantes en el sistema de lodos activados. Por ejemplo, los protozoos y los rotíferos actúan como depuradores de los influentes; los protozoos consumen las bacterias dispersas que no han floculado y los rotíferos consumen cualquier partícula biológica pequeña que no haya sedimentado. Los protozoos, que son muy sensibles a las variaciones de las condiciones del medio, son muy útiles para la explotación de la planta, ya que el hecho de que predomine una determinada especie puede dar una idea del grado de adaptación del lodo activado a la naturaleza del sustrato, de la calidad de la oxigenación, de la presencia de tóxicos, etc. En cuanto a los rotíferos, son indicadores de un sistema biológico particularmente estable.

Los nematodos son característicos de lodos viejos, o en vías de mineralización. Se encuentran frecuentemente en lodos que sufren una digestión aerobia. Más resistentes que los rotíferos, son índice de unas condiciones límites en la vida aerobia.

Algunos hongos pueden participar en la formación de los flóculos en ciertas condiciones: contaminación rica en glúcidos, pH bajo y deficiencias de nitrógeno y fósforo. Son indeseables, puesto que originan un flóculo muy filamentoso y no sedimentable, y constituyen una de las causas de la "enfermedad" más frecuente de los lodos activados: la hinchazón, denominada también "bulking", que repercute en la calidad de los lodos activados, especialmente en su aptitud para sedimentar.

El control eficaz de las condiciones del medio en el tratamiento biológico de las aguas residuales se basa en el conocimiento de los principios básicos que gobiernan el crecimiento de los microorganismos.

Por lo general, las bacterias se reproducen por mitosis, es decir, por división; la célula original se transforma en dos nuevos organismos. El tiempo requerido para cada división oscila entre 20 minutos y varios días; por ejemplo, si el tiempo de generación es de 30 minutos, una bacteria producirá 16.777.216 bacterias tras un periodo de 12 horas, cifra hipotética ya que las bacterias no continuan dividiéndose indefinidamente a causa de diversas limitaciones ambientales, tales como las concentraciones de sustrato y de nutrientes.

La forma general de producirse el crecimiento de las bacterias en un cultivo discontinuo se muestra en la figura 2.8. Como se observa el modelo de crecimiento basado en el número de células tiene cuatro fases diferenciadas:

- Fase de retardo. Tras la adición de un inóculo a un medio de cultivo, representa el tiempo requerido para que los microorganismos se aclimaten a las nuevas condiciones ambientales.
- 2. Fase de crecimiento exponencial. Las bacterias se reproducen a la velocidad correspondiente a su tiempo de reproducción y a su capacidad de asimilar el sustrato.
- 3. Fase estacionaria. La población permanece estacionaria porque las células han agotado el sustrato o los nutrientes requeridos para su crecimiento y la aparición

- de nuevas células se contrarresta por las que mueren. Aparece el metabolismo endógeno, por el cual las bacterias se ven obligadas a metabolizar su propio protoplasma al faltar el alimento exterior.
- 4. Fase exponencial de defunciones. Durante esta fase, la tasa de muerte de las bacterias, función de la población viable y de las características ambientales, excede la producción de células nuevas.

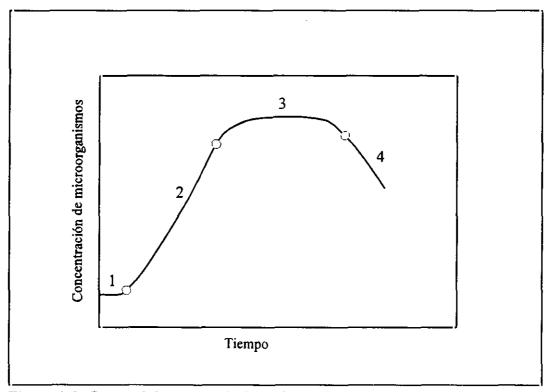


Figura 2.8. Curva típica de crecimiento bacteriano.

Es importante destacar que la anterior discusión se refiere a una sola población de microorganismos. Sin embargo, las unidades de tratamiento biológico se componen de complejas poblaciones biológicas mezcladas e interrelacionadas, en las que cada microorganismo del sistema tiene su propia curva de crecimiento. La posición y forma de una curva particular de crecimiento en el sistema en función del tiempo dependerá del alimento y nutrientes disponibles y de factores ambientales, tales como temperatura y pH.

#### II.2.4. Factores determinantes del desarrollo bacteriano.

El rendimiento óptimo de los microorganismos en los procesos de depuración biológica depende de los otros tres elementos que participan en la reacción de oxidación biológica: la materia orgánica biodegradable, los nutrientes y la aportación de oxígeno. Además se ve afectado por variables físicas y químicas como el pH, la temperatura y la presencia de inhibidores potenciales del proceso.

Materia orgánica. La posibilidad de desarrollar los procesos de oxidación biológica para estabilizar la materia orgánica depende de la estructura química de las moléculas orgánicas que deben ser atacadas, o, dicho de otra forma, de la biodegradabilidad de dichas moléculas. Aunque existen varias teorías para predecir el comportamiento de los compuestos orgánicos por oxidación biológica, el conocimiento real sobre la materia se remite a estudios experimentales.

La biodegradabilidad de un agua residual se determina como relación de la demanda biológica de oxígeno (DBO) a la demanda química de oxígeno (DQO). Con este índice se deduce fácilmente si la sustancia a depurar es de origen doméstico o industrial, e informa sobre el método de depuración más adecuado. Así resulta que si la relación DBO/DQO es mayor de 0,4 el influente residual es biodegradable, pudiéndose utilizar sistemas biológicos por lodos activados (Hernandez, 1994).

Debe tenerse en cuenta, además, el papel que desempeña la propia adaptación de los microorganismos al medio. Una aclimatación adecuada de los microorganismos puede producir el metabolismo en presencia de sustancias que, desde el punto de vista teórico, no son biodegradables e incluso de sustancias directamente tóxicas.

Nutrientes. Además del carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno, el protoplasma celular contiene otros elementos como fósforo, azufre, sodio, potasio, magnesio, calcio, hierro y molibdeno. La mayoría de estos elementos, que se encuentran tan sólo a nivel de trazas, son transportados por las aguas residuales; sin embargo, suele faltar nitrógeno y fósforo,

por eso, en los tratamientos biológicos suele ser necesario añadir estos nutrientes. Las cantidades precisas dependen de las características del agua residual y del tipo de tratamiento biológico, aunque pueden considerarse como representativos los siguientes valores medios: 43 g de N/kg de DBO eliminado y 6 g de P/kg de DBO eliminado (Lora, 1978).

El metabolismo endógeno, esto es, la autoxidación del protoplasma celular que aparece cuando comienza a faltar la materia orgánica utilizada como alimento, supone una liberación del nitrógeno y fósforo empleados previamente para la síntesis de nuevas células. El nitrógeno y fósforo liberados pueden volver a utilizarse, de forma que las necesidades totales de estos elementos son función del grado de metabolismo endógeno y de síntesis, lo que supone que en los procesos de aeración prolongada se registre una demanda mínima de estos elementos.

Oxígeno. Se debe mantener una concentración mínima de oxígeno disuelto en el tanque de aeración entre 1 y 2 mg/l con el fin que las bacterias puedan realizar correctamente la degradación de la materia orgánica biodegradable presente en el agua residual. Si la concentración de oxígeno es pequeña, entre 0 y 0,5 mg/l, los hongos pueden predominar sobre las bacterias; aunque son capaces de metabolizar casi todos los compuestos orgánicos conocidos, en condiciones ambientales óptimas no pueden competir con las bacterias.

Temperatura. En la mayoría de las reacciones en que intervienen microorganismos, la velocidad de reacción aumenta con la temperatura hasta aproximadamente 37°C para descender, a continuación, al morir los microorganismos por desnaturalización de las proteínas del protoplasma celular. La velocidad de reacción se duplica aproximadamente por cada aumento de 10°C de la temperatura.

Aunque muchos microorganismos mesofilicos mueren a unos 40°C, otro grupo, los termofilicos, pueden desarrollarse a temperaturas de hasta 70°C. Existe, por último, un

tercer grupo de microorganismos, conocidos por criofílicos, cuya temperatura óptima de desarrollo está comprendida entre 12 y 18°C.

La influencia de la temperatura también regula la concentración de oxígeno libre disuelto en el agua. Como es conocido, disminuye con el aumento de temperatura.

El pH. El pH del medio influye sobre la velocidad de reacción y, además, sobre los tipos de microorganismos susceptibles de sobrevívir. La mayoría de los microorganismos se desarrollan a un pH óptimo de 7,0 y experimentan ligeras variaciones para valores del pH entre 6,5 y 8,5. Debido a la desnaturalización de las proteínas del protoplasma celular, causada por los iones H<sup>+</sup> y OH<sup>-</sup>, muy pocas bacterias pueden sobrevivir a un pH inferior a 4,0 o superior a 9,5. Los hongos pueden desarrollarse fácilmente a un pH de 4,5 y predominan sobre las bacterias en medios con un valor del pH entre 4,5 y 6,0; parece que este fenómeno se debe al menor contenido de proteínas en el protoplasma celular de los hongos.

Inhibidores. En lo que respecta al contenido de sales no tóxicas para las bacterias disueltas en las aguas residuales, por regla general, puede afirmarse que los microorganismos se adaptan bien hasta concentraciones de 3 g/l. En el proceso de lodos activados no deben sobrepasarse, normalmente, concentraciones de sales de 8 g/l, ya que en este caso los lodos son difíciles de flocular y, en consecuencia, de decantar.

Los metales pesados ejercen un efecto perjudicial sobre los procesos biológicos, ya que actúan sobre los enzimas catalizadores de la síntesis de proteínas, responsables del metabolismo. Muchos de los metales pesados tienden a formar compuestos insolubles que precipitan de la solución, como sólo los iones solubles son tóxicos para los sistemas enzimáticos bacterianos, las características químicas del medio resultan decisivas para determinar la toxicidad de los distintos metales pesados.

El hierro y aluminio precipitan en forma de hidróxidos insolubles y las bacterias pueden tolerar concentraciones elevadas de estos elementos; sin embargo, su acción tóxica puede deberse a que los precipitados pueden recubrir las células e impedir el paso de nutrientes. La toxicidad del cromo depende de su estado de valencia; el cromo hexavalente, soluble, es tóxico, lo que no es el caso del trivalente, que es insoluble. La acción del cobre y del cinc está influída por el pH del medio, ya que precipitan a valores elevados del pH; las bacterias podrán tolerar mayores concentraciones de estos metales en medio alcalino que en medio ácido.

### II.2.5. Características de los lodos activados.

La característica definitoria de un lodo es su población microbiana que debe ser capaz de descomponer una proporción elevada de los contaminantes presentes en las aguas residuales a tratar, a la vez que debe flocular con facilidad.

La población microbiana tiende a adaptarse por sí sola a los nutrientes disponibles, a menos que haya una falta en el balance nutritivo, como la deficiencia de un factor esencial de crecimiento, o una sustancia que pueda ser utilizada como nutriente únicamente por un limitado número de bacterias, o la presencia de una sustancia inhibidora o tóxica. En este caso, se hace necesaria una corrección por dilución o siembra con un cultivo microbiano especialmente desarrollado.

La adaptación de una población microbiana es un proceso lento, especialmente a los bajos niveles de actividad a los que operan, en general, los procesos de tratamiento de aguas residuales. Requiere, aproximadamente, el mismo tiempo que el de residencia celular de los lodos para evolucionar ante un cambio significativo en la composición de la alimentación, de modo que frecuentes cambios en la composición de las aguas residuales pueden producir un lodo que nunca se adapta, en particular, a ningún tipo de alimentación.

El crecimiento en forma de flóculos de los lodos es importante: en primer lugar, para la adsorción y aglomeración de materias iónicas, coloidales y en suspensión presentes en las aguas residuales; y, después, para la rápida, eficiente y económica separación de los lodos procedentes de las aguas residuales tratadas.

La unidad ecológica de los lodos es el flóculo individual. Los flóculos son cúmulos de varios millones de células bacterianas, junto con algunos otros microorganismos y materias inertes, orgánicas e inorgánicas; sin embargo, no se deben considerar como entidades invariantes. Un lodo de buena floculación en un sistema agitado está en equilibrio dinámico entre la tendencia de los flóculos a agregarse en flóculos mayores y

el efecto de desfloculación que produce la turbulencia y que rompe los flóculos en unidades más pequeñas. Sin embargo, son posibles algunas generalizaciones: los flóculos de gran tamaño tienden a formarse principalmente por bacterias muertas rodeadas por bacterias activas viables; los de pequeño tamaño, por su parte, poseen una mayor proporción de bacterias vivas (Stafford y Calley, 1977).

Hubo un tiempo en que la formación de flóculos se atribuía a un microorganismo específico, Z. ramigera, que se creía segregaba una matriz gelatinosa en la que se aglomeraban los otros microorganismos. Se ha demostrado, recientemente, que una amplia variedad de bacterias que se encuentran en los lodos activados son capaces de formar flóculos (Taber, 1976). Además, se ha observado que cuando aumenta el tiempo medio de retención celular mejoran las características de sedimentación del flóculo biológico, debido a que cuando aumenta la edad media de las células la carga superficial de las mismas se reduce y los microorganismos comienzan a producir polímeros extracelulares quedando envueltos en una capa viscosa.

Los problemas de más difícil solución de los lodos activados son los derivados de su separación de las aguas residuales tratadas por floculación y sedimentación debidos a los fenómenos de desfloculación, flóculos "punta de alfiler", el lodo ascendente y el lodo voluminoso ("bulking") (Winkler, 1986). Un patrón para cuantificar la capacidad de asentamiento es el "índice volumétrico del lodo" (IVL), obtenido al permitir que una mezcla de lodos sedimente en condiciones normalizadas. El IVL se define como el volumen en mililitros ocupado por 1 gramo de sólidos en suspensión del líquido mezcla (MLSS), expresado en peso seco, después de sedimentar durante 30 minutos en un cono de Imhoff de 1.000 ml; de manera que un elevado valor de IVL indica un lodo con malas características de sedimentación.

Desfloculación. La desfloculación consiste en la rotura de flóculos en unidades de menor tamaño, lo cual produce turbidez en el sobrenadante de la etapa de separación. Puede ocurrir, incluso, en lodos que en principio presentan buenas características de asentamiento, a cualquier nivel de carga de lodos y simultáneamente con el "bulking". Se

produce en situaciones de operación a bajos niveles de oxígeno disuelto, bajo pH y al choque de cargas tóxicas, traduciendose en una fuerte pérdida de microorganismos que abandonan el sistema en el efluente tratado de manera que el proceso se acerca a una condición de "lavado". A medida que la pérdida de lodos crece aumenta la dificultad de mantener su concentración en el tanque de aeración, con el consiguiente aumento progresivo en las cargas de lodos.

Flóculos punta de alfiler. Los lodos con elevados valores de "edad" aparecen en su mayoría en flóculos pequeños, densos y con excelentes características de asentamiento. Sin embargo, en algunas ocasiones, parte del lodo se presenta como pequeños flóculos, llamados flóculos "punta de alfiler", que permanecen como partículas visibles en el sobrenadante después de que haya sedimentado el resto del lodo. Los flóculos punta de alfiler sólo se han observado en sistemas con baja carga orgánica, menor de aproximadamente 0,2 kg de DBO/kg de sólidos de lodo-día; su presencia es indeseable, ya que permanecen en el efluente tratado después de la separación de los lodos proporcionando un alto contenido residual de materia orgánica.

Lodo ascendente. A veces, el lodo con buenas características de sedimentación asciende hacia la superficie o flota sobre ella tras un período de sedimentación relativamente corto. La causa de este fenómeno es la desnitrificación, por la cual los nitritos y nitratos del agua residual se convierten en gas nitrógeno que queda atrapado en el lodo reduciendo la densidad global del conjunto. Este fenómeno se puede evitar haciendo que los lodos no permanezcan demasiado tiempo en la etapa de separación antes de ser recirculados o purgados. Así se reduce el riesgo de inducir los lodos ascendentes y de producir condiciones anaerobias, lo que llevaría a la formación de lodos malolientes.

Lodo voluminoso (bulking). Un lodo voluminoso es el que posee malas características de sedimentación y de compactabilidad. Su presencia se atribuye al crecimiento de organismos filamentosos u organismos que pueden crecer en forma filamentosa en condiciones adversas, comunicando malas características de sedimentación, ya que los filamentos que se extienden fuera del flóculo aumentan la

resistencia al movimiento y reducen su velocidad de sedimentación, impidiendo también la compactación de los flóculos después del asentamiento. Entre las condiciones que son generalmente asociadas a la presencia de estos lodos destacan la sobrecarga de la planta, la presencia de nutrientes en exceso, temperaturas por encima de 30°C, condiciones ácidas y el descenso de la concentración de oxígeno disuelto por debajo de 1 mg/l.

## II.2.6. Parámetros de operación del proceso.

Se han propuesto diversos parámetros empíricos para el diseño y control de los sistemas biológicos de lodos activados. Entre ellos destacan, por su sencillez y eficacia: la relación alimento-microorganismos (A/M) y el tiempo de retención celular o edad de los lodos ( $\theta_c$ ).

La relación alimento-microorganismos viene dado por la expresión que sirve como ecuación de definición:

$$A/M = \frac{S_0}{\theta \cdot X} \tag{\Pi.1}$$

donde: A/M, es la relación alimento-microorganismos, Kg DBO/Kg MLVSS·día;

S<sub>0</sub>, la concentración de DBO en el agua a tratar, Kg/m<sup>3</sup>;

θ, el tiempo de retención hidráulica en el tanque de aeración, es decir, V/Q, siendo V el volumen del tanque de aeración, m³, y Q, el caudal de agua residual a tratar, m³/día; y

X, la concentración de SSV en el tanque de aeración, Kg/m³.

El tiempo de retención celular es, sin duda, el parámetro más importante de operación en el proceso de lodos activados. Se define como la relación entre la cantidad total de sólidos en los lodos del sistema y la tasa de pérdida de sólidos en los mismos. El cálculo de la cantidad total de sólidos se realiza a partir de los sólidos presentes en la alimentación, en la etapa de aeración, en la etapa de separación y en la línea de recirculación del lodo; la tasa de pérdida, por su parte, incluye los sólidos en los lodos arrastrados por el efluente tratado, así como los que se encuentran en la corriente de lodos de desecho. Sin embargo, una aproximación usual es considerar solamente los sólidos en los lodos en el tanque de aeración y en la corriente de lodos de desecho; en tal caso, el tiempo de retención celular,  $\theta_c$ , está dado por la ecuación:

$$\theta_c = \frac{V \cdot X}{Q_{\omega} \cdot X_{\omega}}$$
 [II.2]

donde: θ<sub>c</sub>, es el tiempo medio de retención celular basado en el volumen del tanque de aeración, días;

V, es el volumen del tanque de aeración, m³;

X, es la concentración de SSV en el tanque de aeración, Kg/m³;

Qw, es el caudal de purga de fangos, m³/día; y

X<sub>w</sub>, es la concentración de SSV en la purga de lodos, Kg/m<sup>3</sup>.

Existe una estrecha relación entre las variables del proceso y las características de floculación y sedimentabilidad del lodo. En la figura 2.9 se presenta un diagrama de esta relación dada por Eckenfelder (1980). Según el mismo, los parámetros de operación deben oscilar: entre 0,2 y 0,5 kg DBO/kg MLVSS·día, la relación alimento-microorganismos; y, entre 8 y 20 días, el tiempo medio de retención celular. En estas condiciones se obtiene un efluente estable y de alta calidad, así como un fango con excelentes características de sedimentabilidad.

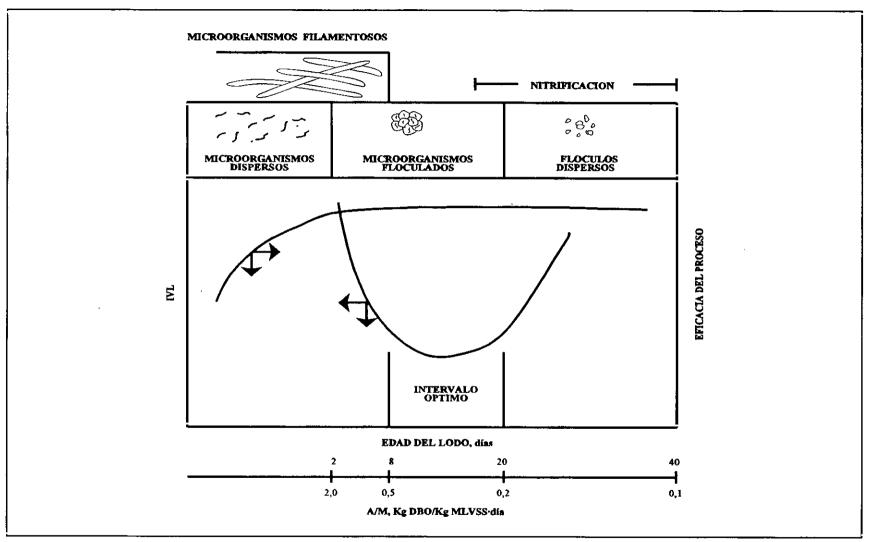


Figura 2.9. Relación entre la eficacia de depuración y la sedimentabilidad del lodo activado con los parámetros de diseño (Eckenfelder, 1980).

# II.3. ENZIMAS: CINÉTICA E INHIBICIÓN.

## II.3.1. Los enzimas en el metabolismo celular.

Las reacciones bioquímicas que comprende la vida son mediadas, casi todas ellas, por una serie de catalizadores biológicos conocidos como enzimas. Por ello, con frecuencia, el metabolismo celular se ha definido como la suma de la totalidad de reacciones enzimáticas que tienen lugar en la célula.

El metabolismo se divide en catabolismo y anabolismo. El catabolismo consiste en la degradación enzimática, en su mayor parte mediante reacciones de oxidación, de moléculas nutritivas relativamente grandes (carbohidratos, lípidos y proteínas) procedentes del entorno de la célula o de sus propios depósitos de reservas nutritivas, hasta transformarlas en moléculas más simples; va acompañado de la liberación de la energía inherente a la compleja estructura de las grandes moléculas orgánicas, conservada en forma de la energía del enlace fosfato del adenosín trifosfato (ATP). Por su parte, el anabolismo es la síntesis enzimática de componentes moleculares relativamente grandes de las células a partir de moléculas precursoras más sencillas.

Los enzimas se clasifican y designan de acuerdo con la naturaleza de las reacciones químicas que catalizan. Existen seis categorías principales (tabla 2.1.).

Tabla 2.1. Clasificación de los enzimas.

Clasificación	Tipo de reacción catalizada	
1. Oxidorreductasas	Reacciones de oxidación-reducción	
2. Transferasas	Transferencias de grupos funcionales	
3. Hidrolasas	Reacciones de hidrólisis	
4. Liasas	Eliminación de grupo para formar enlaces dobles	
5. Isomerasas	Isomerización	
6. Ligasas	Formación de enlaces con ruptura de ATP	

Los enzimas son conocidos por su elevada eficacia ya que pueden reaccionar con una gran cantidad de moléculas de sustrato por minuto, y gran especificidad respecto al sustrato, lo que indica que la célula debe producir un enzima diferente para convertir cada sustrato en productos finales.

Una reacción enzimática puede representarse por la ecuación general:

lo que pone de manifiesto que el enzima funciona como un catalizador, formando un complejo con el sustrato, el cual es seguidamente transformado en un producto y en el enzima original. A continuación, el producto puede ser atacado por otro enzima; de hecho, se recorre una secuencia de complejos y productos intermedios antes de llegar al producto final. La actividad de los enzimas se ve sustancialmente afectada por el pH y la temperatura, así como por la concentración del sustrato; cada enzima posee una temperatura y un pH óptimos de reacción, lo que se refleja en las preferencias respecto al pH y temperatura por parte de la célula.

### II.3.2. Cinética de las reacciones enzimáticas.

En las reacciones catalizadas por enzimas se observa que la velocidad de reacción es directamente proporcional a la concentración de enzima presente en la mezcla; así como que para concentraciones bajas de sustrato la velocidad es proporcional a la propia concentración de sustrato, mientras que para concentraciones elevadas la velocidad resulta independiente de la misma.

Michaelis y Menten (1913) fueron los primeros en explicar este comportamiento con el mecanismo siguiente:

$$E + S \stackrel{k_1}{\rightleftharpoons} ES \stackrel{k_2}{\rightleftharpoons} E + P$$

donde: E, S, ES y P representan, repectivamente, el enzima libre, el sustrato libre, el complejo enzima-sustrato y el producto; y  $k_1$ ,  $k_2$  las correspondientes constantes cinéticas de reacción.

En este mecanismo de reacción la velocidad de desaparición del complejo enzimasustrato constituye la etapa controlante de la reacción, de tal modo que la velocidad del proceso, v, viene dada por:

$$v = k_2 [ES]$$
 [II.3]

Por otra parte, la velocidad de transformación del complejo enzima-sustrato puede representarse según la ecuación:

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[S][E] - k_2[ES] - k_2[ES]$$
 [II.4]

Puesto que la concentración del complejo enzima-sustrato es apreciable, la concentración total de enzima, [E]<sub>0</sub>, es igual a la concentración de enzima libre, [E], más la concentración de enzima en el complejo enzima-sustrato, [ES]; es decir,

$$[E]_0 = [E] + [ES]$$
 [II.5]

En condiciones de equilibrio, en régimen estacionario, se supone que la concentración de los complejos intermedios (complejo enzima- sustrato en este caso) permanece inalterable; por lo tanto, eliminando [E] entre las ecuaciones [II.4] y [II.5], se obtiene:

$$k_1([E]_0 - [ES])[S] - (k_{-1} + k_2)[ES] = 0$$
 [II.6]

de donde:

$$[ES] = \frac{k_1[E]_0[S]}{k_{-1} + k_2 + k_1[S]}$$
 [II.7]

Con todo ello, la velocidad de reacción del proceso se puede expresar con la ecuación:

$$v = \frac{k_2[E]_0[S]}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S]}$$
 [II.8]

El término  $(k_1 + k_2)/k_1$  se denomina constante de Michaelis- Menten y se representa por  $K_m$ , pudiendo reescribirse la ecuación anterior del modo siguiente:

$$v = \frac{k_2[E]_0[S]}{K_{**} + [S]}$$
 [II.9]

en la que recibe el nombre de ecuación de Michaelis-Menten.

Atendiendo al valor de la concentración de sustrato en el medio de reacción pueden hacerse algunas consideraciones. Así, cuando la concentración de sustrato es suficientemente pequeña, el término [S] en el denominador de la ecuación de Michaelis-Menten resulta despreciable frente a  $K_m$ , y la ecuación toma la forma:

$$v = \frac{k_2}{K_m} [E]_0 [S]$$
 [II.10]

lo que indica que en estas condiciones el consumo de sustrato sigue una cinética de primer orden.

Por otra parte, cuando la concentración de sustrato es elevada se tiene que [S]>>Km, y la citada ecuación, entonces, puede expresarse así:

$$v = k_2[E]_0 = V_{\text{max}}$$
 [II.11]

lo que indica que a concentraciones elevadas de sustrato, su consumo se realiza a una velocidad máxima (V<sub>max</sub>) independiente de la concentración. Se supone que a estas concentraciones todos los centros activos de los enzimas están saturados con sustrato y, por ello, la reacción transcurre de la forma más rápida posible, independientemente de la concentración de sustrato (reacción de orden cero).

Atendiendo a esta consideración, ecuación [II.11], la ecuación de Michaelis-Menten, [II.9], puede reescribirse de la forma:

$$v = \frac{V_{\text{max}}[S]}{K_m + [S]}$$
 [II.12]

y sí [S] es igual a K<sub>m</sub>, así:

$$v = \frac{V_{\text{max}}[S]}{[S] + [S]} = \frac{V_{\text{max}}}{2}$$
 [II.13]

Con ello, la constante de Michaelis, K<sub>m</sub>, se puede determinar gráficamente a partir de la relación entre la concentración de sustrato y la velocidad de reacción, lo que de forma gráfica se recoge en la figura 2.10.

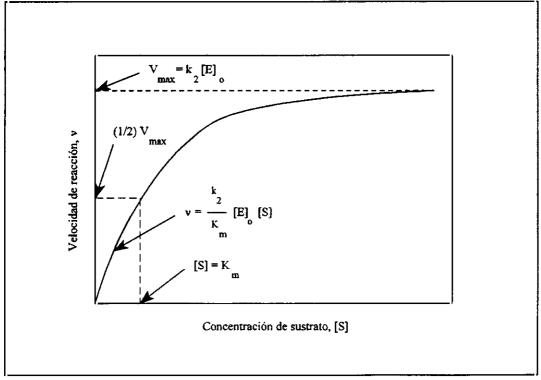


Figura 2.10. Efecto de la concentración del sustrato sobre una reacción enzimática.

La constante, K<sub>m</sub>, es igual a la concentración de sustrato a la cual la velocidad de reacción es la mitad de la velocidad máxima; sin embargo, en la práctica, esta metodología de trabajo proporciona unos valores de los parámetros poco precisos.

Para expresar los resultados experimentales, mediante la ecuación de Michaelis-Menten, se han hecho algunas transformaciones en dicha ecuación. La más utilizada es la que se obtiene, sencillamente, tomando los recíprocos de ambos miembros de la ecuación [II.12]:

$$\frac{1}{v} = \frac{\underline{K}_{m}}{V_{\text{max}}[S]} + \frac{1}{V_{\text{max}}}$$
 [II.14]

La ecuación [II.14] fué sugerida por Lineweaver y Burk en 1934, y representa una línea recta con una pendiente de  $K_m/V_{max}$  y una intersección de  $1/V_{max}$  con el eje 1/v (figura 2.11).

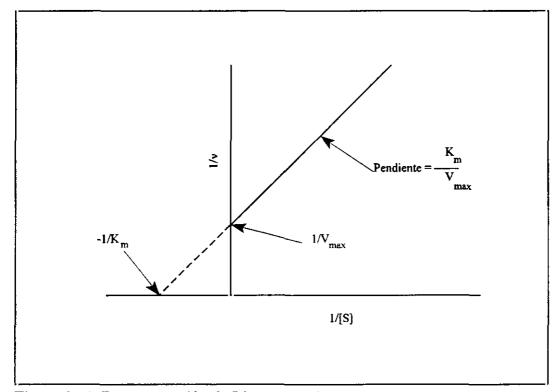


Figura 2.11. Representación de Lineweaver-Burk.

Tiene la ventaja de que  $V_{max}$  puede determinarse con mayor exactitud que a partir de la representación simple de v frente a [S]; en esta última, la aproximación a  $V_{max}$  se alcanza asintóticamente y su valor es, por ello, incierto.

Alternativamente, la ecuación de Michaelis-Menten, ecuación [II.12], se puede poner de la forma:

$$vK_m + v[S] = V_{\text{max}}[S]$$
 [II.15]

Dividiendo ambos miembros de la ecuación [II.15] por [S] y reordenando términos resulta:

$$v = V_{\text{max}} - K_m \frac{v}{[S]}$$
 [II.16]

Así, si se representa  $\nu$  frente a  $\nu/[S]$ , se obtiene la gráfica que muestra la figura 2.12.

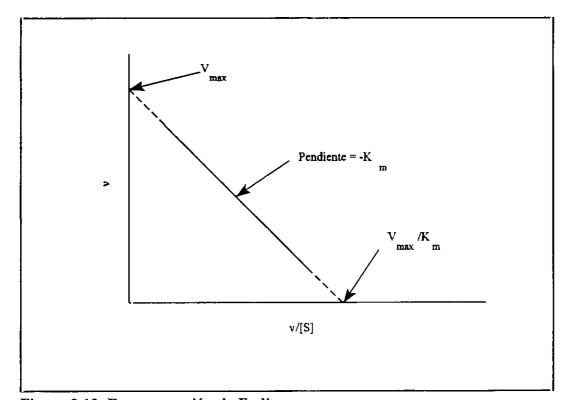


Figura 2.12. Representación de Eadie.

Esta representación, sugerida por Eadie en 1942, no sólo permite obtener  $V_{max}$  y  $K_m$  de forma sencilla, sino que también muestra, muy ampliadas, las discrepancias con el carácter lineal, lo que puede no apreciarse en la representación de Lineaweaver-Burk.

# II.3.3. Efecto del pH sobre la actividad enzimática.

Se encuentra muy frecuentemente que en una representación de  $V_{max}$  frente al pH se obtiene una curva acampanada (figura 2.13). Se observa una velocidad óptima a un pH intermedio, frencuentemente en el intervalo de pH entre 6 y 9.

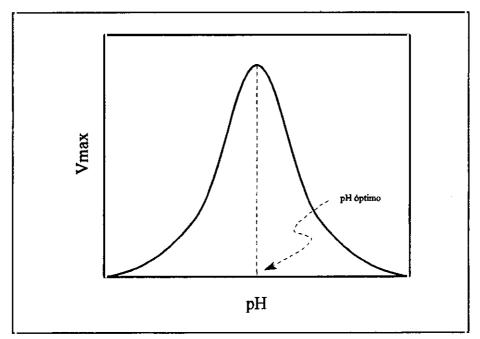


Figura 2.13. Dependencia de  $V_{\text{max}}$  con el pH.

Este comportamiento se explica por la participación de grupos ácidos y básicos en la catálisis enzimática (Metzler, 1981). Este tipo de curva puede interpretarse sencillamente suponiendo la presencia en el centro activo de dos grupos ionizables: -NH<sub>3</sub><sup>+</sup> y -COOH. Como resultado existen tres formas del enzima con diferentes grados de protonación: E, EH y EH<sub>2</sub> (Figura 2.14).

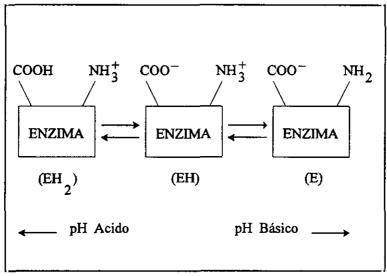


Figura 2.14. Protonación del enzima según el pH.

Si se supone que solamente la forma EH es capaz de originar un complejo enzimasustrato, EHS, que reaccione para dar lugar a productos se obtendría la curva acampanada de la figura 2.14. La frecuente observación de este tipo de curva apoya el razonamiento anterior, el cual se resume en el mecanismo de reacción representado en la figura 2.15.

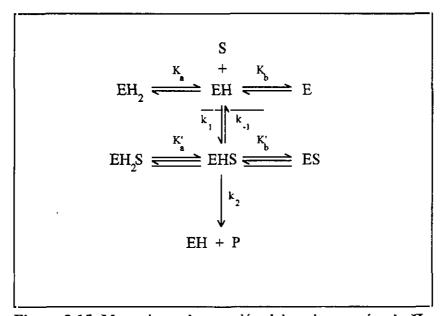


Figura 2.15. Mecanismo de reacción del enzima según el pH.

# II.3.4. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática.

La dependencia de la actividad enzimática con la temperatura presenta un valor máximo, debido a que al incremento termodinámico de la constante de velocidad de reacción (curva 1 en figura 2.16) le sigue la disminución de la actividad enzimática a causa de la degradación térmica del enzima (curva 2 en figura 2.16). De forma general, el óptimo se localiza a temperatura entre 40° y 60°C (Ullmann, 1987).

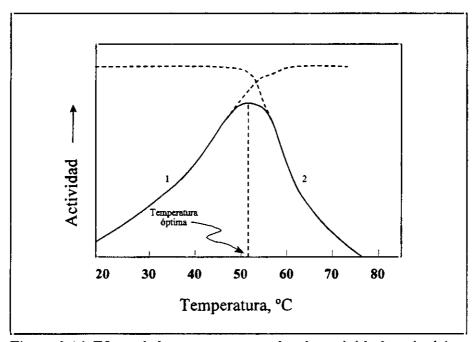


Figura 2.16. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática.

#### II.3.5. Inhibición de los enzimas.

Son inhibidores de enzimas aquellas sustancias que, específicamente, disminuyen la velocidad de las reacciones enzimáticas, pudiendo ser el efecto irreversible o reversible. La inhibición irreversible implica, habitualmente, la destrucción o modificación de uno o más grupos funcionales del enzima; la reversible puede ser competitiva o no competitiva, y su tratamiento cuantitativo admite la relación de Michaelis-Menten (Mihalyi, 1972).

Inhibición competitiva. Como su nombre indica el inhibidor competitivo compite con el sustrato natural del enzima por el centro activo; por tanto, tendrá una estructura similar a la del sustrato y, por mimetismo, se unirá al enzima e imposibilitará su actividad catalítica. La inhibición competitiva es reversible y puede ser superada incrementando la concentración de sustrato; su efectividad está determinada por la afinidad del enzima hacia el sustrato y el inhibidor.

El mecanismo de reacción es similar al discutido en el apartado II.3.2, si bien considerando una nueva reacción: la que supone la unión del enzima (E) y del inhibidor (I) para formar, de modo reversible, un complejo enzima-inhibidor (EI). Esta reacción se puede representar por:

$$E + I \stackrel{k_i}{\rightleftharpoons} EI$$

El complejo El no puede, sin embargo, escindirse para formar productos de reacción del modo que lo hace el complejo ES; por otra parte, la constante de equilibrio del complejo EI viene dada por la expresión:

$$K_{I} = \frac{\underline{k}_{i}}{k_{i}} = \frac{[\underline{E}]_{-}[\underline{I}]}{[\underline{E}I]}$$
 [II.17]

La ecuación de la velocidad de reacción en presencia del inhibidor se calcula siguiendo la metodología empleada para obtener la ecuación de Michaelis-Menten, teniendo únicamente en cuenta la nueva relación de equilibrio y que ahora el valor de [E]<sub>0</sub> corresponde al valor dado por la expresión:

$$[E]_0 = [E] + [ES] + [EI]$$
 [II.18]

Con ello la ecuación de velocidad de reacción en este tipo de sistemas en presencia de inhibidores viene dado por:

$$v = \frac{V_{\text{max}} [S]}{[S] + K_m + [I] \frac{K_m}{K_I}}$$
 [II.19]

La existencia del fenómeno de inhibición competitiva se reconoce mediante el empleo de la representación gráfica de Lineweaver-Burk, para lo que la anterior ecuación debe expresarse de la forma:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\text{max}}} + \frac{K_I + I}{K_I} \frac{K_M}{V_{\text{max}}} \frac{1}{[S]}$$
 [II.20]

representando, entonces, 1/v frente a 1/[S] y haciendo variar la concentración de inhibidor.

Así, en la inhibición verdaderamente competitiva las representaciones de Lineweaver-Burk se caracterizan porque se obtienen rectas de pendientes diferentes, que tienen un punto de intersección común sobre el eje 1/v (figura 2.17), lo que indica que la  $V_{max}$  no se altera por la presencia de un inhibidor competitivo. Además, se demuestra que la presencia de inhibidor en el sistema conduce a la obtención de un valor de  $K_m$  aparente mayor que el verdadero.

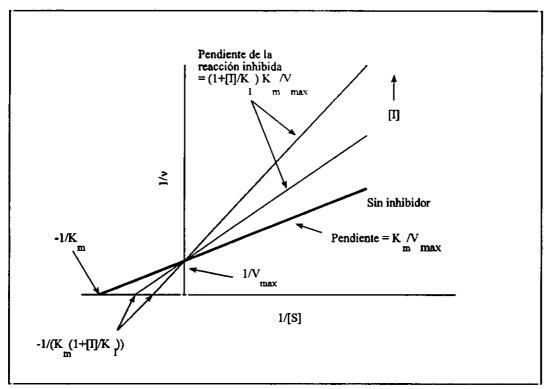


Figura 2.17. Representacion de Lineweaver-Burk de la inhibición competitiva.

Inhibición no competitiva. En este caso, la actividad enzimática se inhibe por compuestos que no tienen ninguna relación estructural con el sustrato y, por tanto, no resulta invertida por el aumento de la concentración de sustrato. Es presumible que el inhibidor se una a otra porción del enzima distinto que el de su unión con el sustrato; puede unirse al enzima libre, al complejo ES o a ambos, lo que puede representarse con las dos ecuaciones:

$$E + I \stackrel{k_i}{\rightleftharpoons} EI$$

$$ES + I \stackrel{k_i}{\rightleftharpoons} ESI$$

En este caso, la distribución del enzima entre las diversas especies viene dado por la ecuación:

$$[E]_0 = [E] + [ES] + [EI] + [ESI]$$
 [H.21]

Como la velocidad del proceso es proporcional a [ES], ecuación [II.3], y todas las especies que contienen inhibidor se consideran inactivas, la ecuación de velocidad puede expresarse en los siguientes términos:

$$v = \frac{K_I}{K_I + [I]} \frac{V_{\text{max}}[S]}{K_m + [S]}$$
 [II.22]

Tambien en este caso, la inhibición no competitiva se reconoce de forma sencilla mediante las representaciones de Lineweaver-Burk, en presencia de varias concentraciones de inhibidor:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_I + [I]}{K_I} \frac{1}{V_{\text{max}}} + \frac{K_I + [I]}{K_I} \frac{K_m}{V_{\text{max}}} \frac{1}{[S]}$$
 [II.23]

En la inhibición no competitiva las rectas tienen diferentes pendientes, pero no presentan un punto de intersección común sobre el eje  $1/\nu$  (figura 2.18). La intersección sobre el eje  $1/\nu$  es mayor para el enzima inhibido que para el no inhibido, lo cual indica que la  $V_{max}$  ha disminuido por acción del inhibidor y no puede recuperarse por muy elevada que sea la concentración del sustrato.

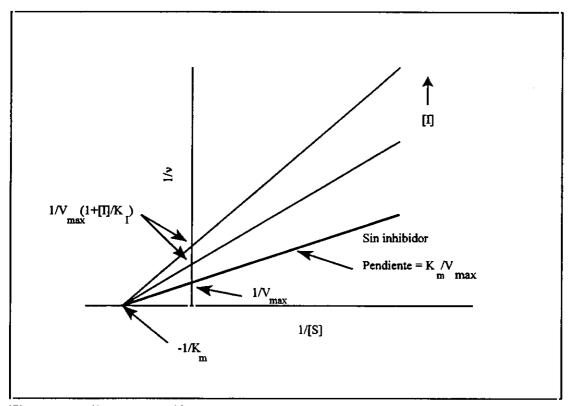


Figura 2.18. Representación de Leneweaver-Burk de la inhibición no competitiva.

El tipo más corriente de inhibición no competitiva es el que ofrecen los reactivos que pueden combinarse reversiblemente con los grupos sulfhidrilos (-SH) de los restos de cisteína, esenciales para la actividad catalítica de algunos enzimas. Los iones metálicos pesados, o sus derivados, inhiben estos enzimas formando mercáptidos de los grupos -SH, de tal manera que la cantidad de enzima en forma de mercáptido está en rápido equilibrio con el ion metálico libre, es decir:

$$E-SH + Me' \leftarrow E-S-Me + H'$$

Tales grupos -SH pueden estar localizados en el propio centro catalítico o bien pueden hallarse situados a alguna distancia del mismo. En este último caso, no obstante, pueden ser esenciales para la actividad catalítica, porque ayudan a mantener la conformación tridimensional específica de la molécula enzimática.

Inhibición irreversible. Se produce por la unión mediante enlaces covalentes del inhibidor con los centros activos del enzima.

Es importante distinguir entre inhibición no competitiva e inhibición irreversible. El tratamiento cuantitativo de Michaelis-Menten de la inhibición competitiva y de la no competitiva supone que la combinación del enzima con el inhibidor es reversible, pero si el inhibidor reacciona irreversiblemente, el tratamiento de Michaelis-Menten no resulta aplicable. Cuando se añade un inhibidor irreversible en exceso sobre el enzima, la inhibición puede ser, al principio, incompleta, pero continuará aumentando con el tiempo, porque se produce una inhibición total de una fracción creciente de moléculas del enzima, mientras las restantes continúan siendo totalmente activas.

Algunos inhibidores irreversible actúan "lesionando" la molécula enzimática por modificación química de su estructura; en este caso, el enzima modificado todavía es activo, pero actúa a velocidad reducida. Para poner de manifiesto esta clase de inhibición se necesitan métodos específicos.

#### III.1. OBJETIVO Y PROGRAMA EXPERIMENTAL.

El objetivo de nuestra investigación es desarrollar un método que permita determinar la actividad de las proteasas bacterianas del lodo activado, en diferentes condiciones de operación y ante la presencia de agentes tóxicos como son los metales pesados, empleando una proteína natural como sustrato de hidrólisis. Con ello, se pretende demostrar que la actividad enzimática del lodo activado puede ser cuantificada mediante la valoración de los enlaces peptídicos rotos durante la reacción de hidrólisis.

El programa de investigación desarrollado ha sido el siguiente:

- 1°) Selección del procedimiento analítico para valorar los enlaces peptídicos rotos en el transcurso de la reacción enzimática.
- 2°) Determinación de la concentración de sustrato que se halla por encima del nivel de saturación, de modo que la velocidad de reacción sea de orden cero respecto al sustrato.
- 3°) Determinación del pH óptimo de hidrólisis.
- 4°) Estudio de la influencia de la temperatura sobre la actividad enzimática del lodo activado.
- 5º) Estudio de la influencia de la edad del lodo activado sobre su actividad enzimática.
- 6°) Efectos de los iones metálicos Cu(II) y Zn(II) como potenciales inhibidores de los procesos enzimáticos.

La influencia de las condiciones de operación, así como el efecto de los metales pesados sobre los procesos enzimáticos, se han determinado mediante el cálculo de la velocidad de hidrólisis máxima específica, V<sub>max e</sub>, definida como:

$$V_{\text{max},e} = \frac{V_{\text{max}}}{SST}$$
 [III.1]

donde  $V_{max}$  es la velocidad de hidrólisis máxima calculada a partir del incremento en la concentración de grupos amino libres en el hidrolizado proteíco con el tiempo, en las condiciones de experimentación en que las proteasas se encuentran saturadas de sustrato; y, SST es la concentración de biomasa en el ensayo, expresada como sólidos en suspensión totales.

### III.2. MATERIALES.

#### III.2.1. Lodo activado.

Los lodos activados utilizados en este trabajo se han generado en una planta piloto de tratamiento de aguas residuales que funciona por el sistema convencional de lodos activados, constituída por dos unidades idénticas en cada una de las cuales se cultiva un lodo de edad determinada.

Para que el lodo se encuentre siempre en las mismas condiciones, una vez extraído del tanque de aeración de la correspondiente unidad, debe decantar durante 30 minutos en un cono de Imhoff de 1 litro de capacidad. Transcurrido este tiempo se separa el sobrenadante y se centrifuga el sólido durante 5 minutos a 3.000 r.p.m, en una centrífuga Selecta modelo Centromix. Seguidamente se suspende el sólido en agua destilada, determinándose la concentración de biomasa de la nueva suspensión por espectrofotometría visible.

## III.2.2. Sustrato de hidrólisis.

La elección del sustrato susceptible de ser hidrolizado por los microorganismos constituye un factor clave a la hora de la correcta determinación de la actividad enzimática del lodo activado.

La utilización de un carbohidrato -tal como el almidón- fué descartada, ya que las técnicas analíticas utilizadas para el seguimiento de la hidrólisis de los enlaces glucosídicos se basan en la determinación de los azúcares reductores que se forman en el transcurso de la reacción y estos productos son utilizados inmediatamente por los microorganismos en los sistemas biológicos, como fuente de carbono y energía en su metabolismo, lo que hace imposible su cuantificación.

58

En este sentido, la única posibilidad para el seguimiento de la hidrólisis de un carbohidrato por acción de los microorganismo presentes en el lodo activo es la determinación de su velocidad de desaparición. Sin embargo, ésta no es una técnica fiable ya que se necesita que la concentración de carbohidrato sea elevada para garantizar la cinética de orden cero. Otro problema añadido surge en el caso de que se produjese una rápida adsorción del sustrato sobre el lodo, lo que impediría cuantificar la velocidad de hidrólisis.

Ambas situaciones se evitan utilizando proteínas como sustrato. En efecto, su hidrólisis enzimática por la acción del lodo activado puede cuantificarse mediante la valoración de los enlaces peptídicos rotos, ya que de esta forma se valoran y cuantifican productos intermedios de reacción que no pueden ser metabolizados por los microorganismos.

En este trabajo por razones únicamente económicas, se han seleccionado dos proteínas para hacer el seguimiento de la actividad enzimática de las bacterias integrantes del lodo activado: caseína de leche de oveja y gelatina de piel de cerdo, ambas suministradas por Fluka.

# III.3. EQUIPO EXPERIMENTAL.

# III.3.1. Planta piloto de tratamiento de aguas residuales.

La planta piloto de depuración mediante lodos activados utilizada para obtener los lodos empleados en el trabajo se muestra en la figura 3.1.

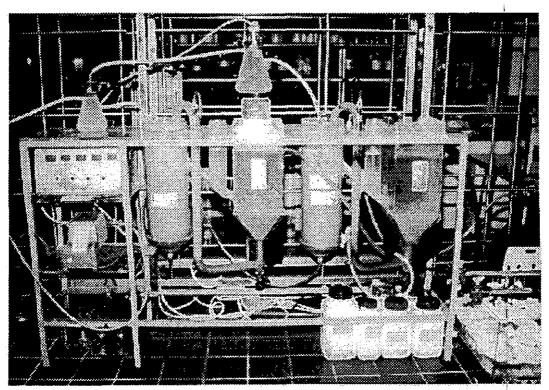


Figura 3.1. Planta piloto de lodos activados.

Está constituída por dos unidades idénticas. Cada una consta de un tanque de aeración, provisto de un difusor de vidrio sinterizado en su parte inferior, y un sedimentador, construidos en metacrilato, con capacidades de cinco y seis litros, respectivamente.

La alimentación de aguas rediduales a cada una de las unidades se realiza desde un único depósito de 125 litros de capacidad mediante una bomba dosificadora de membrana tipo CF 0410, con accionamiento magnético, longitud variable de carrera y control electrónico del número de éstas. La bomba impulsa al influente a un erlenmeyer de 500

ml, el cual por rebose alimenta un segundo erlenmeyer de igual capacidad; desde estos erlenmeyer se produce la alimentación a cada uno de los tanques de aeración a través de las correspondientes válvulas de membrana. El caudal excedente de solución alimento rebosa del segundo erlenmeyer para volver al deposito de alimentación.

Como solución alimento se utilizó agua residual sintética equilibrada en carbono, nitrógeno y fósforo. Como fuente de carbono se utilizó glucosa; como fuente de nitrógeno, cloruro amónico; y, como fuente de fósforo, una mezcla de di-potasio hidrógeno fosfato y potasio di-hidrógeno fosfato que en las concentraciones utilizadas actúa, a la vez, como tampón, manteniendo el medio a pH=7,0. Las concentraciones de estos compuestos en la solución alimento se indican en la tabla 3.1; su disolución se llevó a cabo con agua corriente, la cual aporta la concentración de sales y oligoelementos necesarios para el crecimiento microbiano.

La concentración de oxígeno disuelto en los tanques de aeración se mantiene por encima de 2 mg/l, controlando el flujo de aire procedente del compresor con un rotámetro instalado en la línea de aire.

Tabla 3.1. Composición del agua residual sintética.

Compuesto	Concentración (mg/l)
D(+)-Glucosa, C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> (PANREAC, purísimo)	500 <sup>(*)</sup>
Cloruro amónico anhídro, NH4Cl (PANREAC, purísimo)	250
Di-potasio hidrógeno fosfato anhídro, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (PANREAC, purísimo)	1.750
Potasio di-hidrogeno fosfato anhidro, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (PANREAC, purisimo)	250

<sup>(\*)</sup> Equivalente a una DBO<sub>5</sub> de 373±17 mg (Rodier, 1989), la cual se encuentra dentro de las concentraciones generalmente encontradas en las aguas residuales urbanas (Ronzano y Dapena, 1995).

La recirculación de lodos desde los sedimentadores a los tanques de aeración se realiza de forma intermitente mediante dos pequeñas bombas mamut actuadas por aire y reguladas por dos válvulas magnéticas tipo Lucifer 121 A 02, cuyo tiempo de actuación e intervalo transcurrido entre dos operaciones sucesivas es controlado por un mecanismo electrónico de control tipo Bircher 5943.

La puesta en marcha de la planta piloto de tratamiento se llevó a cabo inoculando en los tanques de aeración lodo procedente de la EDAR de "La China". El caudal de alimentación se fijó en 0,7 l/h, con el fín de obtener un tiempo de residencia hidráulico de 7h, tiempo adecuado para las condiciones de alimentación utilizadas (Metcalf-Eddy, 1985). El tiempo de retención celular se fijó en 10 días en una unidad y 14 en la otra, para lo que diariamente se extrajeron como purga 500 y 350 ml de los tanques de aeración.

Ambas unidades se mantuvieron en funcionamiento durante 30 y 45 días, periodo equivalente a tres veces el tiempo de retención celular, con objeto de conseguir su estabilización; transcurrido este tiempo el lodo de purga se empleó para realizar los correspondientes ensayos.

La calidad del tratamiento alcanzado en la planta y, por tanto, de los lodos que contiene, se determinó de forma periódica mediante el análisis de parámetros típicos de operación, tales como el contenido en materia orgánica, en términos de carbono orgánico total (COT) en el influente y en el efluente; la concentración de biomasa, en términos de concentración de sólidos en suspensión totales (SST); el índice volumétrico de lodos (IVL); la concentración de oxígeno disuelto en el tanque de aeración y el pH del medio. La temperatura de la suspensión del depósito de aeración se dejó evolucionar libremente, oscilando entre los 12 y 24°C, debido a los cambios ambientales.

Para la determinación del COT se utilizó un analizador Rosemount Analytical Inc. modelo DC-190, empleando como patrón de calibrado una solución de 100 mg/l de ftalato potásico para el influente y de 10 mg/l para el efluente.

La concentración de biomasa en los depósitos de aeración se determinó por espectrofotometría visible mediante un espectrofotómetro UV-Visible de doble haz Varian modelo Cary 1E.

El IVL se obtuvo de acuerdo con el método estandar referido en la bibliografía y expuesto en el apartado II.2.5. de esta memoria.

La concentración de oxígeno disuelto en el depósito de aeración se siguió con un oxímetro WTW Oxi 96; el pH mediante un phmetro CRISON micropH 2001 y la temperatura mediante un termómetro de mercurio.

En la tabla 3.2. se resumen los valores medios de los parámetros de operación de ambas unidades de tratamiento biológico.

Tabla 3.2. Parámetros de operación de las unidades de lodos activados.

Parámetro	Unidad 1	Unidad 2
Caudal alimento, l/día	17	17
COT influente, mg/l	200	200
COT efluente, mg/l	22	21
Oxígeno Disuelto, mg/l	2,4	2,7
pН	7,0	7,0
Tiempo retención hidráulico, horas	7	7
Tiempo retención celular, días	10	14
SST en tanque de aeración, mg/l	2600	3400
IVL, ml/g	135	155

#### III.3.2. Sistema de reactores en discontinuo.

El equipo experimental utilizado para la determinación de la velocidad de hidrólisis del sustrato por acción del lodo activado se muestra en la fotografía de la figura 3.2. Para la realización de los experimentos se dispuso de dos equipos como el de la figura.

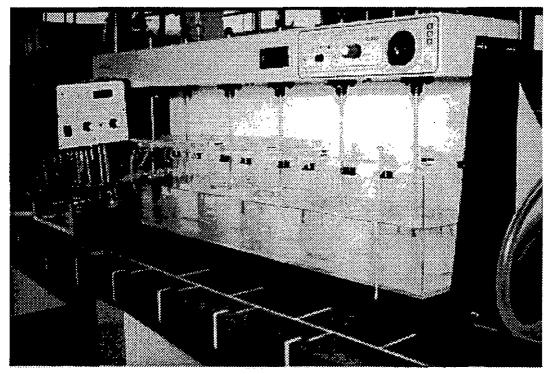


Figura 3.2. Sistema de reactores en discontinuo.

Los ensayos de hidrólisis enzimática se realizaron en vasos de precipitados de 500 ml de capacidad, provistos de agitación y sumergidos en un baño termostático para mantener constante la temperatura durante el tiempo de reacción.

La agitación de la disolución, formada por la proteína y el lodo activado, se consiguió mediante un equipo de floculación marca SBS modelo FC-6 que consta de seis agitadores mecánicos de pala que giran simultáneamente a la misma velocidad. En todos

los ensayos al menos uno de los agitadores se dedicaba a la agitación del baño, con objeto de evitar la aparición de gradientes de temperatura.

La uniformidad de temperatura se lograba en un baño termostático de agua, construido en metacrilato, donde se sumergían los vasos de precipitados. La temperatura se mantenía constante mediante un termostato de inmersión marca Selecta modelo "Digiterm 100" con selección y lectura digital de la temperatura entre +5°C y 99,9°C; como algunos ensayos se realizaron por debajo de la temperatura ambiente se dispuso, también, de una unidad refrigeradora para baños marca Selecta modelo "Frigedor".

### III.4. DETERMINACIONES ANALÍTICAS.

#### III.4.1. Concentración de biomasa.

La concentración de biomasa se determina de forma directa, únicamente, mediante el peso de material celular que contiene un determinado volumen de cultivo. Esta determinación supone, en primer lugar, la separación de las células del propio medio, su secado y posterior pesada, lo que se traduce, en definitiva, en un método tedioso y poco sensible.

Conocido experimentalmente que las partículas pequeñas difractan la luz de manera proporcional a su concentración, dentro de ciertos límites, se ha pensado que la utilización de este método óptico puede resultar adecuado para cuantificar la biomasa presente en el medio. Así, de forma indirecta, pero rápida y fiable, basándose en la reducción de la cantidad de luz transmitida por un haz luminoso al pasar a través de una suspensión bacteriana, puede determinarse la concentración de la masa celular en un medio de cultivo.

Ya que la difracción es inversamente proporcional a la cuarta potencia de la longitud de onda de la luz que se difracta, la sensibilidad de las medidas se incrementa bruscamente si se utiliza luz de longitud de onda más corta; generalmente para la cuantificación de la biomasa se utilizan longitudes de onda comprendidas entre los 420 y 650 nm (Staner y col., 1986). Por eso, en la investigación a que se refiere esta memoria, la concentración de biomasa se ha determinado por espectrofotometría visible, utilizando un espectrofotómetro UV-Visible Varian modelo Cary 1E, y seleccionando como longitud de onda más adecuada según bibliografía (Jørgensen y col, 1992-b) 450 nm.

Determinación de la recta de calibrado. De acuerdo con la ley de Lambert-Beer la concentración de soluto es directamente proporcional a la absorbancia de la solución, de tal modo que la concentración de biomasa puede determinarse experimentalmente

mediante una recta de calibrado que relacione la absorbancia de una suspensión de microorganismos con la masa celular de la misma.

La elaboración de la recta de calibrado se realizó tomando un volumen de lodo; la suspensión se dividió en cuatro alícuotas de 10 ml cada una: tres de éstas se centrifugaron durante 10 minutos a 3.500 r.p.m. en una centrifuga Selecta modelo Centromix, posteriormente se resuspendieron en agua destilada y volvieron a centrifugarse, repitiéndose esta operación dos veces más con objeto de eliminar las sales; el sedimento se secó en estufa a 105°C, durante 24 horas, y se determinó su peso en balanza de precisión (±0,0001 g), calculándose el valor medio de las tres medidas. Por otra parte, se determinó la absorbancia de la cuarta alícuota a la longitud de onda seleccionada. La repetición sucesiva de este proceso con diferentes grados de dilución de la suspensión de lodo activado permitió obtener los puntos necesarios para trazar la recta de calibrado.

El ajuste de los datos experimentales se realizó mediante el software MicroCal Origin versión 2.8, con el que se obtuvo la ecuación de calibrado:

$$C = -2.12 + 548.74 \cdot A_{450}$$
 [III.2]

donde C es la concentración de biomasa en mg/l, y A es la absorbancia a la longitud de onda indicada. En la figura 3.3. se representa la recta de calibrado y las hipérbolas representativas de los límites de confianza para un nivel de significación del 95%.

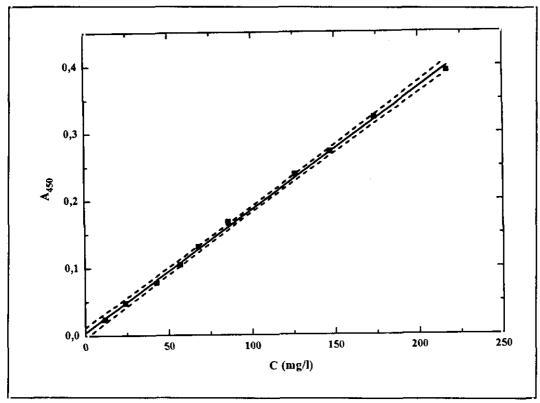


Figura 3.3. Recta de calibrado para la determinación de la biomasa a 450 nm.

En la tabla 3.3. se presentan los datos estadísticos de la ecuación de calibrado, así como las ecuaciones representativas de los límites de confianza, obtenidas ajustando ambas hipérbolas a una ecuación de segundo orden.

La ley de Lambert-Beer se cumple hasta un valor de absorbancia de 0,4. Esto significa que la concentración límite a analizar mediante el espectrofotómetro empleado es aproximadamente de 220 mg/l; para analizar suspensiones más concentradas deben diluirse.

Tabla 3.3. Ecuación de calibrado y límites de confianza para la determinación de la concentración de biomasa.

BIOMASA: R	ECTA DE CALIBRA	CION A 450 nm		
	$C (mg/l) = A + B \cdot A_{450}$	,		
<u>Parámetro</u>	Valor	ds		
A	-2,12	1,48		
В	B 548,74 6,97			
R = 0.9994				
DS =2,5901				
$P = 7,568 \cdot 10^{-13}$				
Lfr	nite Superior de Confi	anza		
C(m	$\mathbf{g}/\mathbf{I}) = \mathbf{A}_0 + \mathbf{A}_1 \cdot \mathbf{A}_{450} + \mathbf{A}_2$	$A_{450}^2$		
Parámetro	Valor	ds		
$A_0$	2,374	0,027		
A <sub>1</sub> 526,93 0,32				
A <sub>2</sub>	60,83	0,80		
R = 1				
DS = 0.0729				
Li	mite Inferior de Confia	inza		
C(m	$\mathbf{g}(\mathbf{I}) = \mathbf{A}_0 + \mathbf{A}_1 \cdot \mathbf{A}_{450} + \mathbf{A}_2$	A <sup>2</sup> 450		
Parámetro	Valor	ds		
$ A_0$	-6,610	0,027		
A <sub>1</sub>	570,55	0,32		
A <sub>2</sub>	-60,83	0,80		
R = 1				
DS = 0.0729				

# III.4.2. Actividad enzimática de las proteasas. Método del TNBS.

La degradación hidrolítica de las cadenas peptidicas que constituyen las proteínas transcurre según un proceso catalizado por las enzimas denominadas proteasas, según la reacción:

El grado de ionización de la amina y el ácido carboxílico formados después de la hidrólisis de la proteína depende del pH de la reacción. Los valores de los pK<sub>a</sub> de los grupos -COOH y -NH<sub>3</sub><sup>+</sup> en los polipéptidos están comprendidos entre 3,1-3,6 y 7,5-7,8, respectivamente (Steinhardt y Beychok, 1964; Rupley, 1967). Por tanto, el grupo carboxilo no se encontrará disociado a pH inferiores a 2, se encontrará parcialmente disociado entre pH 2 y 5, y lo estará completamente a pH superiores a 5. Por su parte, el grupo amino estará completamente protonado por debajo de pH 6, parcialmente protonado entre pH 6 y 9,5, y no estará protonado por encima de pH 9,5.

El proceso supone cesión y/o captura de H<sup>+</sup>, lo que se traduce en una variación del pH del medio, a excepción de que éste se sitúe entre 5 y 6, ya que en este caso el intercambio de protones se compensa mutuamente. Por debajo de pH 3,1-3,6 menos de la mitad de los grupos carboxilo se encuentran disociados mientras que los grupos amino están completamente protonados; entonces, se produce una captura neta de 0,5 a 1 equivalente de H<sup>+</sup> por cada equivalente de enlaces peptídicos rotos, si el pH no se encuentra tamponado se observa un rápido incremento en el mismo. A la inversa, para valores de pH por encima de 7,5-7,8 al menos la mitad de los grupos amino están protonados y todos los grupos carboxilo completamente disociados, lo cual provoca una

cesión neta de 0,5 a 1 equivalente de H<sup>+</sup> por cada equivalente de enlaces peptidicos rotos; en consecuencia, el pH disminuye si no se encuentra tamponado.

En resumen, para valores de pH mayores o menores que el intervalo dado por los correspondientes pKs de los grupos amino y carboxilo, la reacción de hidrólisis a pH constante transcurre con el consumo de considerables cantidades de ácido o de base para titular los grupos amino y carboxilo liberados. Así, resulta obvio que si el pH permanece constante, por ejemplo a pH=8, la relación entre equivalentes de enlaces peptídicos rotos y equivalentes de base consumida será proporcional; la constante de proporcionalidad es el grado de hidrólisis, α, del -NH<sub>3</sub><sup>+</sup>, es decir:

$$\alpha = \frac{10^{pH-pK}}{1 + 10^{pH-pK}}$$
 [III.3]

Este es el principio de la técnica del pH-estato (Jacobsen y Léonis, 1951; Jacobsen y col, 1957) para el seguimiento en continuo del grado de hidrólisis durante la reacción. Sin embargo, en la práctica, esta técnica es más complicada pues la determinación del pK del hidrolizado proteíco, como se ha visto, es la cuestión a resolver a la hora de la calibración de los equipos, y, desafortunadamente, el pK de los grupos amino no permanece constante, varía con la naturaleza de los aminoácidos terminales, la longitud de las cadenas peptídicas y la temperatura (Steinhardt y Beychok, 1964).

Como consecuencia de los inconvenientes apuntados, las técnicas que se basan en la determinación del incremento de grupos amino libres son las más ampliamente utilizadas para el seguimiento de las reacciones de hidrólisis de proteínas, conocida, además, su alta fiabilidad y sencillez de operación. Existen varios métodos, entre los que cabe destacar la reacción con ninhidrina (Moore y Stein, 1948), fluorescamina (Felix y col., 1975), o-ftaldehido (García Alvarez-Coque y col, 1989; Medina Hernández y col., 1991) o con el ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico (Satake y col. 1960; Mokrasch, 1967; Burger, 1974; Snyder and Sobocinski, 1975; Adler-Nissen, 1979).

El empleo del ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico (TNBS) para la determinación de la concentración de grupos amino libres de proteínas e hidrolizados proteícos ha sido aceptado de forma unánime como el más adecuado desde su introducción por Satake y col. en 1960; no obstante, el procedimiento original ha sido modificado por Morkrasch (1967) para permitir la determinación de aminas, aminoácidos y proteínas en mezclas. En ambos procedimientos la reacción de trinitrofenilación es seguida por una etapa de congelación con metanol a 0°C, después de la cual la concentración de grupos amino se relaciona con el incremento en la absorbancia de la solución a 340 nm o a 420 nm.

Con posterioridad, Snyder y Sobocinski (1975) estudiaron, también, la reacción de trinitrofenilación, proponiendo que el contenido en grupos amino libres puede ser relacionado directamente con la absorbancia a 420 nm de la mezcla resultante de la reacción de trinitrofenilación después de un corto periodo de incubación (15-30 minutos) a 25°C, ya que en estas condiciones se desarrolla más del 98% del color. La supresión de la etapa de congelación de la reacción de trinitrofenilación mejora la sensibilidad del método, pues se elimina la dilución del color causada por el metanol.

Por todo ello, la determinación de la actividad de las proteasas bacterianas del lodo activado, en este trabajo, se realiza por cuantificación del incremento de la concentración de grupos amino libres en la solución de hidrolizado proteíco, utilizando la modificación del método del TNBS propuesto por Snyder y Sobocinski.

Determinación de la recta de calibrado. La reconocida importancia del tiempo y la temperatura de incubación en el método de análisis seleccionado aconsejan, en primer lugar, determinar el rendimiento de trinitrofenilación de la glicina, aminoácido tomado como patrón, a tres concentraciones y tres temperaturas diferentes (figura 3.4).

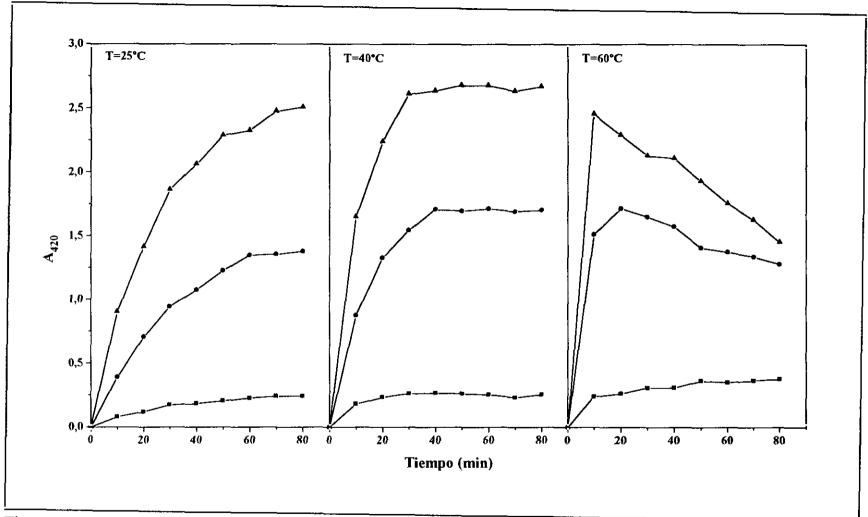


Figura. 3.4. Rendimiento de trinitrofenilación en función del tiempo y la temperatura de incubación de la glicina en concentraciones 5·10·5 M (■), 2,5·10·4 M (●) y 5·10·4 M (▲).

Cada uno de los valores que se representan en las gráficas de la figura 3.4, corresponden a la medida de la absorbancia a 420 nm, en un espectrofotometro UV-Visible de doble haz Varian modelo Cary 1E, de una muestra que se obtuvo mezclando: 2 mililitros de glicina (Fluka) de concentración que se indica, 2 mililitros de tetraborato sódico (Panreac, grado análisis) 0,2M y 25 microlitros de TNBS (Fluka) 0,03M, que se incubó en un baño termostático a la temperatura y durante el tiempo indicado. Los resultados muestran que a 25°C, la reacción no llega a completarse en el intervalo de tiempo de ensayo; la reacción de trinitrofenilación se completa en 40 minutos para una temperatura de 40°C; mientras que a 60°C se observa la perdida del color desarrollado en la solución.

En consecuencia, para obtener la recta de calibrado se utilizaron las cantidades y concentraciones de reactivos indicadas anteriormente a la temperatura de incubación de 40°C, durante 40 minutos.

La ecuación de calibrado resultante del ajuste de los datos experimentales obtenidos al analizar soluciones de glicina de concentración conocida fué:

$$C = 0.94 + 13.55 \cdot A_{420}$$
 [III.4]

donde: C es la concentración de glicina en 10<sup>5</sup>·mol/l; y, A es la absorbancia a la longitud de onda indicada. En la figura 3.5. se representa la recta de calibrado y las hipérbolas representativas de los límites de confianza para un nivel de significación del 95%.

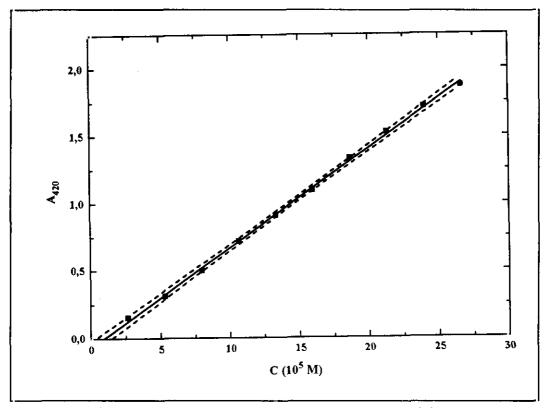


Figura 3.5. Curva de calibrado para la determinación de glicina a 420 nm.

En la tabla 3.4 se recogen, además, los datos estadísticos de la ecuación de calibrado, así como las ecuaciones representativas de los límites de confianza obtenidas tras el ajuste de ambas hipérbolas a una ecuación de segundo orden.

La ley de Lambert-Beer se cumple hasta un valor de absorbancia de 1,8, lo que viene a decir que la concentracion límite a analizar mediante el espectrofotómetro es, aproximadamente, de 25·10<sup>-5</sup> mol/l; las disoluciones más concentradas deben diluirse.

Tabla 3.4. Ecuación de calibrado y límites de confianza para la determinación de la concentración de grupos amino libres.

GLICINA: RI	CTA DE CALIBRAC	ION A 420 nm
	$C (10^5 M) = A + B \cdot A_{420}$	·
Parámetro	Valor	ds
<u>A</u>	0,94	0,19
B	13,55	0,17
R = 0,9994		
DS=2,2961		
$P = 5,638 \cdot 10^{-13}$		
Lin	ite Superior de Confi	anza
C(10 <sup>5</sup>	$\mathbf{M}) = \mathbf{A}_0 + \mathbf{A}_1 \cdot \mathbf{A}_{420} + \mathbf{A}_1$	$\frac{\mathbf{A}^2_{420}}{\mathbf{A}^2_{420}}$
Parámetro	Valor	ds
A <sub>0</sub>	1,532	0,003
<b>A</b> ,	12,9439	0,0074
A <sub>2</sub>	0,3032	0,0038
R = 1		
DS= 0,008		
Lin	nite Inferior de Confia	nza
C(10 <sup>5</sup>	$\mathbf{M}) = \mathbf{A}_0 + \mathbf{A}_1 \cdot \mathbf{A}_{420} + \mathbf{A}_{5}$	- A <sup>2</sup> <sub>420</sub>
Parámetro	Valor	ds
$\mathbf{A}_0$	0,340	0,003
A <sub>1</sub>	14,1631	0,0074
A <sub>2</sub>	-0,3032	0,0038
R = 1		
DS = 0.008		

### III.5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.

El plan de trabajo presentado en el apartado III.1 de esta memoria, se ha desarrollado en dos series de ensayos:

- La primera se dirige a la determinación de la actividad de un lodo activado bajo diferentes condiciones de operación en la planta de tratamiento; y,
- la segunda, para cuantificar la influencia que ejerce la presencia de diferentes cantidades de Cu(II) y Zn(II) sobre la actividad del lodo.

En todos los casos, para facilitar el estudio cinético del proceso de tal modo que la velocidad de reacción resulte de orden cero respecto al sustrato --proporcional únicamente a la concentración de enzima activa presente en el medio--, se ha trabajado en las condiciones en que la concentración de sustrato se encuentra por encima del nivel de saturación.

Para ello, en un primera etapa, se determinó el nivel de saturación de las proteasas del lodo activado utilizando como sustrato caseína y gelatina, con el objetivo añadido de seleccionar para los ensayos posteriores aquél que generase una mayor cantidad de grupos amino libres en el transcurso de la reacción.

En una segunda etapa, otra secuencia de ensayos, a diferentes pH, temperaturas y edad del lodo, informó sobre la influencia de estas variables en la reacción de hidrólisis de la proteína, y, en consecuencia, sobre la propia actividad del lodo activado.

Por último, en una tercera etapa, se realizaron ensayos de hidrólisis con la presencia en el medio de diferentes cantidades de Cu(II) y de Zn(II), tanto de forma individual como en mezclas, variando, además, el pH y la edad del lodo.

Así, a partir del incremento en la concentración de grupos amino libres entre la disolución inicial de proteína y de hidrolizado en función del tiempo, expresado como concentración de glicina en moles/l que genera la misma absorbancia, se determinó la velocidad máxima de hidrólisis ( $V_{max}$ ) en las condiciones de ensayo experimentadas. Con ella, y conocida la concentración de biomasa en el ensayo, se obtuvo la velocidad máxima específica de hidrólisis ( $V_{max,e}$ ), variable que se ha elegido como la más representativa para llevar a cabo todo el estudio.

La forma de operar en cualquiera de los ensayos realizados consistió en la preparación de 100 ml de disolución de proteína de la concentración programada, fijándose el pH de la experimentación mediante adición de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Panreac, purísimo) y, por otra parte, se preparó una mezcla de 100 ml de lodo activado, en la cual se había determinado previamente la concentración de biomasa, y 50 ml de solución tampón de fostato 0,02 M. Ambas soluciones, una vez atemperadas a la temperatura de ensayo en el baño termostático, se mezclaban en un vaso de precipitados de 500 ml provisto de tabiques deflectores y agitación a 150 r.p.m para mantener el lodo en suspensión.

El seguimiento de la reacción se realizó extrayendo periódicamente 5 ml de muestra del hidrolizado proteico que inmediatamente se introducían en viales de 10 ml con tapón roscado y junta de teflón, y se colocaban en un termostato de bloque metálico marca Selecta modelo "Multiplazas" a 150°C durante 2 minutos, con objeto de paralizar la reacción por desnaturalización del enzima. Posteriormente se enfriaban y centrifugaban durante 10 minutos a 3.000 r.p.m en una centrífuga marca Selecta modelo "Centromix", tomándose 2 ml del sobrenadante para el análisis de los grupos amino libres.

En el caso del estudio de aguas rediduales que contenían iones metálicos, la única diferencia en el procedimiento experimental radicó en que se preparó una mezcla de 75 ml de lodo activado, 25 ml de solución de CuSO<sub>4</sub> ó ZnSO<sub>4</sub> (PANREAC, grado análisis) de concentración tal que se alcanzara la de ensayo en el volumen final de mezcla, y 50 ml de solución tampón de fosfatos 0,02 M. Esta suspensión se mantuvo en agitación a la

temperatura de ensayo durante 1 hora, tiempo estimado suficiente para alcanzar el equilibrio de adsorción del metal sobre el lodo.

#### III.6. RESULTADOS EXPERIMENTALES.

## III.6.1. Selección del sustrato y de su nivel de saturación.

La primera etapa de la experimentación tuvo como objetivo determinar, por una parte, la proteína a utilizar como sustrato de las proteasas soportadas por el lodo activado y, por otra, la concentración de la misma que llega a saturar a las citadas enzimas.

Los ensayos correspondientes se han realizado con lodos de 10 días de edad, a pH 7 y temperatura de 25°C, manteniendo constante la concentración de biomasa y variando la de sustrato, siguiendo el incremento en la concentración de grupos amino libres en el hidrolizado proteico expresado por la concentración de glicina que presenta su misma absorbancia.

Las tablas 3.6.1 a 3.6.5 recogen los resultados de los experimentos en los que se utilizó caseína como sustrato y alícuotas de lodo activado procedentes de una misma purga del tanque de aeración de la planta piloto. Por su parte, las tablas 3.6.6 a 3.6.10 recogen los resultados de los experimentos en los que se utilizó gelatina como sustrato y alícuotas de lodo activado procedente de una misma purga del tanque de aeración, si bien diferente a la de los ensayos anteriores.

La nomenclatura utilizada para la presentación de estos resultados es la siguiente:

[S], es la concentración de sustrato en el ensayo, en mg/l.

pH, es el pH del medio.

T, es la temperatura de reacción, en °C.

SST, es el intervalo de confianza para un nivel de confianza del 95% de la concentración de biomasa en el ensayo, expresada como sólidos en suspensión totales, en mg/l.

 $\theta_c$ , es la edad del lodo, expresada en días.

Tabla 3.6.1. Hidrólisis de caseína. Influencia de la concentración de sustrato. Experimento: SS-1-1.

Glicina (10 · M)
Gucina (10 · M)
3,0
6,4
10,6 14,2
15,8
17,3
21,1
22,7
25,2
25,6
27.0
29,4

Tabla 3.6.2. Hidrólisis de caseína. Influencia de la concentración de sustrato. Experimento: SS-1-2.

$\{S\} = 2000 \text{ mg Caseina/l}$ $pH = 7.0 \pm 0.1$ $T = 25.0 \pm 0.1 \text{ °C}$	$SST = 900 \pm 21 \text{ mg/l}$ $\theta_c = 10 \text{ d}$
<u>Tiempo (min)</u>	Glicina (10 · M)
15	5,4
30	10.1
45	15.2
60	18.0
75	21.9
90	25.0
105	27.6
120	29,2 30,1
135 150	31.5
165	34,7
180	35.9

Tabla 3.6.3. Hidrólisis de caseína. Influencia de la concentración de sustrato. Experimento: SS-1-3.

[S] = 3000 mg Caseina/l pH = $7 \pm 0.1$ T = $25.0 \pm 0.1$ °C	$SST = 900 \pm 21 \text{ mg/l}$ $\theta_c = 10 \text{ d}$
Tiempo (min)	Glicina (10 · M)
15	6,4
30	10,7
45	16,1
60 75	19.4
75 90	20,9
105	27,8
120	31,3 35,3
135	33,3
150	38,3
165	42,4
180	46,6

Tabla 3.6.4. Hidrólisis de caseína. Influencia de la concentración de sustrato. Experimento: SS-1-4.

[S] = 4000 mg Caseína/l  pH = $7.0 \pm 0.1$ T = $25.0 \pm 0.1$ °C	$SST = 900 \pm 21 \text{ mg/l}$ $\theta_{c} = 10 \text{ d}$
<u>Tiempo (min)</u>	Glicina (10 · M)
15	5,3
30	10,7
45	15,0
60	17,2
75	24.2
90	27.8
105	31,7
120	37.0
135	41.6
150 165	45.9
180	 56,5

Tabla 3.6.5. Hidrólisis de caseína. Influencia de la concentración de sustrato. Experimento: SS-1-5.

[S] = 5000 mg Caseina/l	$SST = 900 \pm 21 \text{ mg/l}$
$pH = 7.0 \pm 0.1$	$\theta_{c} = 10 \text{ d}$
T = 25,0 ± 0,1 °C	
Tiempo (min)	Glicina (10 M)
15	5,2
30	8,8
45	13,7
60	17,5
75	23,4
90	27,7
105	31,7
120 135	36,1
150	40,4
165	43,2 49,4
100	53,4

Tabla 3.6.6. Hidrólisis de gelatina. Influencia de la concentración de sustrato.

Experimento: SS-2-1.

[S] = 2000 mg Gelatina/l pH = $7.0 \pm 0.1$ T = $25.0 \pm 0.1$ °C	$SST = 983 \pm 19 \text{ mg/l}$ $\theta_{c} = 10 \text{ d}$
<u>Tiempo (min)</u>	Glicina _(10: <u>M</u> )_
15	9,3
30	21,6
45	28.2
60	35,4
75	39.8
90	42,5
105	47.4
120	53,5
135	55,1
150 165	62,8 67,4
180	73,9
160	15.7
}	

Tabla 3.6.7. Hidrólisis de gelatina. Influencia de la concentración de sustrato.

Experimento: SS-2-2.

$\theta_c = 10 \text{ d}$
Glicina (10 · M)
11,5
21,0
29,4
35,6
45,2
56.5
62,3
67,5
79,7
85,3
85,5
95,1

Tabla 3.6.8. Hidrólisis de gelatina. Influencia de la concentración de sustrato. Experimento: SS-2-3.

[S] = 6000 mg Gelatina/l pH = $7.0 \pm 0.1$ T = $25.0 \pm 0.1$ °C	$SST = 983 \pm 19 \text{ mg/l}$ $\theta_c = 10 \text{ d}$
Tiempo (min)	Glicina (10 · M)
15	12.8
30 ·	26.3
45	34.9
60	47.8
75	57,1
90	66.7
105	77,6
120	87.8
135	101,5
150	113,4
165	126,5
180	140,6

Tabla 3.6.9. Hidrólisis de gelatina. Influencia de la concentración de sustrato. Experimento: SS-2-4.

[S] = 8000 mg Gelatina/l pH = $7.0 \pm 0.1$ T = $25.0 \pm 0.1$ °C	$SST = 983 \pm 19 \text{ mg/l}$ $\theta_{c} = 10 \text{ d}$
<u>Tiempo (min)</u>	Glicina (10 · M)
15	13,8
30	27,0
45	30,7
60	47.2
75	54,9
90	68,2
105	82,4
120 135	94,5 94,6
150	111,2
165	116.9
180	130,0

Tabla 3.6.10. Hidrólisis de gelatina. Influencia de la concentración de sustrato. Experimento: SS-2-5.

[S] = 10000 mg Gelatina/l pH = $7.0 \pm 0.1$ $T = 25.0 \pm 0.1$ °C	$SST = 983 \pm 19 \text{ mg/l}$ $\theta_c = 10 \text{ d}$
<u>Tiempo (min)</u>	Glicina (10 · M)
15	15,4
30	22.9
45	37.0
60	46.7
75	55,8
90	6,68
105	79.0
120	85,4
135	102,2
150 165	110,8
165	121,6

# III.6.2. Efectos del pH y de la temperatura.

La segunda etapa de la experimentación ha tenido como objetivo el estudio de la influencia del pH y de la temperatura sobre la actividad del lodo activado.

Para ello, utilizando gelatina como sustrato y lodo de 10 días de edad, se realizaron dos series de ensayos replicados, cada una con 5 experimentos simultáneos a 25°C de temperatura y valores de pH de 5,5, 6,7, 8 y 8,5. En cada una de estas series se utilizó lodo activado procedente de dos volúmenes de purga obtenidos del tanque de aeración de la planta piloto en días diferentes. Las tablas 3.6.11 a 3.6.20 recogen los resultados experimentales pertenecientes a estos ensayos.

Posteriormente, se realizaron 3 series de ensayos a pH 7, que a su vez se componen de dos juegos de 3 experimentos simultáneos a dos temperaturas diferentes. Como en el estudio de la influencia del pH, el lodo activado utilizado en cada serie de ensayos procede de volúmenes de purga del tanque de aeración realizadas en días diferentes. En las tablas 3.6.21 a 3.6.26 se presentan los resultados de los experimentos realizados a 10° y 35°C, en las tablas 3.6.27 a 3.6.32 los realizados a 15° y 30°C y en las tablas 3.6.33 a 3.6.38 los realizados a 20° y 25°C.

Como en las condiciones de experimentación ensayadas se alcanza el nivel de saturación del enzima por el sustrato, los datos cinéticos se han ajustado a una recta mediante el programa de cálculo MicroCal Origin v. 2.8., representando la pendiente de dicha recta la velocidad máxima de hidrólisis  $(V_{max})$ , a partir de la cual se calcula la velocidad máxima específica de hidrólisis  $(V_{max,e})$ , toda vez que también se conoce la concentración de biomasa en cada ensayo (SST).

La nomenclatura para la representación de estos resultados experimentales es la utilizada en el punto anterior, a la que hay que añadir los símbolos siguientes:

A, es la concentración de glicina a tiempo cero, expresada en 10<sup>5</sup>·mol/l.

 $V_{max}$ , es la velocidad máxima de reacción, expresada en  $10^5$ ·mol Glicina/l·min. ds, es la desviación estándar de A y  $V_{max}$ .

t, es el valor de la t de Student para N-1 grados de libertad y un nivel de confianza del 95% (Montgomery, 1991).

R, es el coeficiente de correlación de la regresión lineal.

DS, es la desviación estándar de la regresión lineal.

P, es el nivel de significión del coeficiente de correlación de la regresión lineal.

N, es el número de puntos experimentales utilizados en la regresión.

 $V_{max,e}$ , es el intervalo de confianza para un nivel de confianza del 95% de la velocidad máxima específica, expresado en µmol Glicina/mg SST·hora.

Tabla 3.6.11. Influencia del pH en la actividad enzimática del lodo activado.

Experimento: HG-1-1.

[S] =	6000 mg Gelatina/I	SST	$t = 670 \pm 21 \text{ mg/l}$
pH =	$5,5 \pm 0,1$	$\Theta_{_{\mathbf{c}}}$	= 10 d
T =	25,0 ± 0,1 °C		
Tier	mpo (min)	Cii	cina (10 M)
<u>_1161</u>		<u> </u>	
	15 30		4,7 8,4
	45		15,2
	60		19,3
	75		21,3
	90		28,2
	105 120		30,2 37,0
	135		40,5
	150		43,1
	165 180		47.1 53,5
		<del> </del>	
Determinación de V u	por regresión lineal	de los datos cinéticos:	Glicina = A + V · Tiempo
Determinación de V n <u>Parámetros</u>	por regresión lineal <sub>oax</sub>		Glicina = A + V · Tiempo
		<u>or</u> <u>d</u> s	
<u>Parámetros</u>	<u>Val</u> a	<u>w</u> <u>ds</u> 6 0,75	<u>1 : ds</u>
<u>Parámetros</u> A V	<u>Val</u> a 0,9 0,28	<u>w</u> <u>ds</u> 6 0,75	<i>1∴ds</i> 1,35
<u>Parámetros</u> A V <sub>max</sub>	Vala 0,9 0,28 0,997 N	<u>ds</u>	<i>1∴ds</i> 1,35
Parámetros  A  V  max  R =	0,9 0,28 0,997 N 1,225	<u>ds</u>	<i>1∴ds</i> 1,35

Tabla 3.6.12. Influencia del pH en la actividad enzimática del lodo activado.

Experimento: HG-1-2.

$pH = 6.0 \pm$	0,1	θ	= 10 d	
T = 25,0 ±	0,1 °C			
<u>Tiempo (mi</u>	n)	GI	cina (10 · M)	
15				
30			 19,2	
45 60			22,3	
75			29.3	
90 105			31,1 40,5	
120			41.7	•
135 150			49,0 51,5	
165			59,1	
180			62,9	
Determinación de V por re	gresión lineal de los c	latos cinéticos:	Glicina = A +	V · Tiempo
Determinación de V por re max	gresión lineal de los o Valor	latos cinéticos:	Glicina = $A + \frac{1 \cdot ds}{1 \cdot ds}$	V · Tiempo max
Parámetros				V · Tiempo max
<u>Parámetros</u> A	Valor	ds	<u>1 · ds</u>	V · Tiempo max
<i>Parámetros</i> A V	<i>Valor</i> 3,53	1,37 0,011	<u>t÷ds</u> 2.51	V · Tiempo
Parámetros A V max	3,53 0,330	1,37 0,011	<u>t÷ds</u> 2.51	V · Tiempo max
A $V_{max}$ $R = 0.995$	3,53 0,330	1,37 0,011	<u>t÷ds</u> 2.51	V · Tiempo wax

Tabla 3.6.13. Influencia del pH en la actividad enzimática del lodo activado.

Experimento: HG-1-3.

** 70.	g Gelatina/l		C = 670 ± 21 r	
$pH = 7.0 \pm 0$		$\theta_{c}$	= 10 d	
$T = 25.0 \pm 0$	0,1 °C			
<u>Tiempo</u> (mir	a)	CI	icina (10 · M)	
	<u>u_</u>	, CIII		
15 30			 17,0	
45			21,0	
60			31,3	
75			35,6	
90				
105 120			49,4 56,6	
135			<b>56</b> ,6 <b>6</b> 6,9	
150			71,5	
165			78,2	
			89,0	
180				<u>-</u>
Determinación de V por reg max			Glicina = A + V	· Tiempo
Determinación de V por reg max <u>Parámetros</u>	<u> Y</u> alor	ds	Glicina = A + V	· Tiempo
Determinación de V por reg max <i>Parámetros</i> A	<u>Yalor</u> 0,99	ds 1,32	Glicina = $A + V_n$ $\frac{t \cdot ds}{2.42}$	· Tiempo
Determinación de V por reg max <u>Parámetros</u>	<u> Y</u> alor	ds	Glicina = A + V	· Tiempo
Determinación de V por reg <u>Parámetros</u> A	<u>Yalor</u> 0,99	1,32 0.011	Glicina = $A + V_n$ $\frac{t \cdot ds}{2.42}$	· Tiempo
Determinación de V por reg <u>Parámetros</u> A V max	0,99 0,476	1,32 0.011	Glicina = $A + V_n$ $\frac{t \cdot ds}{2.42}$	· Tiempo
Determinación de V por reg  Parámetros  A  V max  R = 0,998	0,99 0,476	1,32 0.011	Glicina = $A + V_n$ $\frac{t \cdot ds}{2.42}$	· Tiempo

Tabla 3.6.14. Influencia del pH en la actividad enzimática del lodo activado. Experimento: HG-1-4.

pH =	8,0 ± 0,1	$\theta = 10 d$	
T =	25,0 ± 0,1 °C	c	
Tier	npo (min)	Glicina (10 M)	<del></del>
	15		
	30	16,9	
	45	22.7	
	60 75	26,4 31,2	
	90	40,3	
	105	49.6	
	120 135	55,3 57,2	
	150	63,7	
	165 180	72.7 76.0	
	<u> </u>		
eterminación de V	por regresión lineal de	los datos cinéticos: Glicina = A + V	· Tiempo
eterminación de V n <u>Parámetros</u>	por regresión lineal de valor	los datos cinéticos: Glicina = $A + V_{ma}$	· Tiempo
<u>Parámetros</u>			· Tiempo
<u>Parámetros</u> A	<u>Valor</u>	<u>ds t∶ds</u>	· Tiempo
<u>Parámetros</u> A	3,63 0,409	1,51 2,74 0,013 0,024	· Tiempo
<u>Parámetros</u> A V max	3,63 0,409 0,995 N =	1,51 2,74 0,013 0,024	· Tiempo
Parámetros  A  V  max  R =	0,995 N = 2,068	1,51 2,74 0,013 0,024	· Tiempo

Tabla 3.6.15. Influencia del pH en la actividad enzimática del lodo activado.

Experimento: HG-1-5.

	ielatina/l		$\Gamma = 670 \pm 21 \text{ mg/s}$	
$pH = 8,5 \pm 0,1$		9	= 10 d	
$T = 25.0 \pm 0.1$	°C			
<u>Tiempo</u> (min)		Gi	<u>;</u> i <u>cina (10∙M)</u>	
15		-212		
30			 14,0	
45				
60			22,8	
75			27.1	
90			41.0	
105			45,6	
120 135			48,1 53,0	
150			58,0	
165				
180				
Determinación de V $_{max}$ por regre	sión lineal de los	datos cinéticos:	Glicina = A + V	Tiempo
	sión lineal de los <u>Valor</u>	datos cinéticos:	Glicina = $A + V$ $\frac{i \cdot ds}{}$	Tiempo
Determinación de V por regre				Tiempo
Determinación de V por regre max <u>Parámetros</u>	<u>Valor</u>	<u>ds</u>	<u>1 · ds</u>	Tiempo
Determinación de V por regre <u>Parámetros</u> A	1,89 0,385	<u>ds</u> 2.87	<u>1 · ds</u> 5,34	Tiempo
Determinación de V por regre <u>Parámetros</u> A V max	1,89 0,385	2.87 0,028	<u>1 · ds</u> 5,34	Tiempo
Determinación de $V_{max}$ por regre $\frac{Parámetros}{A}$ $V_{max}$ $R = 0.985$	1,89 0,385	2.87 0,028	<u>1 · ds</u> 5,34	Tiempo

Tabla 3.6.16. Influencia del pH en la actividad enzimática del lodo activado.

Experimento: HG-2-1.

	Gelatina/I	SS	$T = 807 \pm 1$	9 mg/l
$pH = 5.5 \pm 0.$	1	θ	= 10 d	
$T = 25.0 \pm 0.$	1 °C			
<u>Tiempo (min)</u>	_	<u>.G</u>	icina (10 · M)	<u>.</u>
15			3,5	
30			8,1	
45 60			13,1 18,4	
75			20,5	
90			25,5	
105 120			30,8 34,7	
135			41,0	
150 165			50,3 54,9	
180			59,8	
Determinación de V por regre	esión lineat de l	os datos cinéticos:	Glicina = A +	V Tiempo
Determinación de V por regro max	esión lineal de l <u>Valo</u> r	os datos cinéticos: ds	Glicina = $A + \frac{1}{t} \cdot ds$	· V · Tiempo
max  Parámetros				· V · Tiempo max
max  Parámetros	<u>Valo</u> r	ds	į÷ds	V Tiempo
max ***  **Parámetros**  A  V	<u>Valo</u> r -3,17	ds 1,24 0,011	1 · ds 2.23	V Tiempo
Parámetros  A  V max	<u>Valo</u> r -3,17 0,341	ds 1,24 0,011	1 · ds 2.23	V Tiempo
$\frac{Parámetros}{A}$ $V_{max}$ $R = 0,995$	<u>Valo</u> r -3,17 0,341	ds 1,24 0,011	1 · ds 2.23	V Tiempo

Tabla 3.6.17. Influencia del pH en la actividad enzimática del lodo activado.

Experimento: HG-2-2.

(S) =	6000 mg Gelatina/l	$SST = 807 \pm 19 \text{ mg/l}$
pH =	6,0 ± 0,1	$\theta_{c} = 10 d$
T =	25,0 ± 0,1 °C	
Tien	npo (min)	Glicina (10 · M)
	15	10,1
	30	16,0
	45 60	21,6
	75	35,4
	90 105	43,7 52,4
	120	56.6
	135	71.0
	150 165	71.9 78.0
	180	
<del></del>		
		s datos cinéticos: Glicina = $A + V$ · Tiemp
<u>Parámetros</u>	<u>Valor</u>	<u>ds</u> <u>1·ds</u>
<u>Parámetros</u>		
<i>Parámetros</i> A	<u>Valor</u>	<u>ds</u> <u>1·ds</u>
<i>Parámetros</i> A V	2,05 0,462	ds     1 · ds       0,78     1,45       0,008     0,014
Parámetros A V max	2,05 0,462 0,999 N =	ds     1 · ds       0,78     1,45       0,008     0,014
Parámetros  A V max  R =	0,999 N =	ds     1 · ds       0,78     1,45       0,008     0,014

Tabla 3.6.18. Influencia del pH en la actividad enzimática del lodo activado.

Experimento: HG-2-3.

$pH = 7,0 \pm 0,$	1	θ	= 10 d	
$T = 25,0 \pm 0,$	1 °C			
<u>Tiempo</u> (min)		GI	cina (10 · M)	
15			3,1	
30			22.0	
45 60			26,7 35,8	
75			46,0	
90			58,1	
105 120			65.3 79.8	
135			82,5	
150				
165 180			96,1 109,0	
			<del></del>	
Determinación de V por regr	esión lineal de los c	latos cinéticos:	Glicina $\approx A + V$	· Tiempo
Determinación de V por regr max	esión lineal de los d Valor	latos cinéticos:	Glicina $\approx A + V$	· Tiempo
max <u>Parámetros</u>			r	· Tiempo
max <i>Parámetros</i> A	Valor	ds	t : <u>ds</u>	· Tiempo
max <i>Parámetros</i> A	-0,09	2,34 0,022	<u>t : ds</u> 4,24	· Tiempo
max <u>Parámetros</u> A  V  max	-0,09 0.613	2,34 0,022	<u>t : ds</u> 4,24	· Tiempo
Parámetros $A$ $V$ $max$ $R = 0,994$	-0,09 0.613	2,34 0,022	<u>t : ds</u> 4,24	· Tiempo

Tabla 3.6.19. Influencia del pH en la actividad enzimática del lodo activado.

Experimento: HG-2-4.

_	Gelatina/l		$T = 807 \pm 19 \text{ mg}.$	, i
$pH = 8.0 \pm 0.$	,i	θ	= 10 d	
$T = 25,0 \pm 0$	,1 °C			
Tiempo (min	1	G	licina (10 · M)	
15	F .	= <u></u>	8,5	
30			21,5	
45			26,1	
60				
75 90			39,1 51,1	
105			51,1 61,2	
120				
135			76,3	
150 165			89,7 93,1	
			101.6	
180				
Determinación de V por regr			Glicina ≈ A + V max	Tiempo
	resión lineal de l <u>V</u> alor	los datos cinéticos; ds		Tiempo
Determinación de V por regr			Glicina ≈ A + V max	Tiempo
Determinación de V por regr max	<u>V</u> alor	ds	Glicina = $A + V$ max $t \cdot dx$	Tiempo
Determinación de V por regr <u>Parámetros</u> A	<u>V</u> alor 0,98	ds 1,66 0,015	Glicina = $A + V_{\text{max}}$ $t \cdot dx$ 3,05	Tiempo
Determinación de V por regr <u>Parámetros</u> A V max	<u>V</u> alor 0,98 0,564	ds 1,66 0,015	Glicina = $A + V_{\text{max}}$ $t \cdot dx$ 3,05	Tiempo
Determinación de V por regr <u>Parámetros</u> A  V  max  R = 0,997	<u>V</u> alor 0,98 0,564	ds 1,66 0,015	Glicina = $A + V_{\text{max}}$ $t \cdot dx$ 3,05	Tiempo

Tabla 3.6.20. Influencia del pH en la actividad enzimática del lodo activado.

Experimento: HG-2-5.

	[S] = 6	0000 mg Gela	tina/I	5	$SST = 807 \pm$	19 mg/l
	pH =	$8,5 \pm 0,1$			$\theta_{c} = 10 \text{ d}$	
	T = 2	25,0 ± 0,1 °	PC PC			
	Tiemn	00 (min)			Glicina (10 · M	n
	<u> </u>	15			10,2	<u>v</u>
		30			15,2	
		45			20,9	
	•	60			26,2	
		75 90			40,9 47,8	
		105			58,0	
		120			63,2	
		135			71,6	
		150 165			77,0 	
		180				
	ación de V max				s: Glicina = A -	+ V · Tiempo
Determin	ación de V max		n lineal de l Valor	os datos cinéticos ds		+ V · Tiempo
	ación de V max				s: Glicina = A -	+ V · Tiempo
<u>Paráme</u>	ación de V max		Valor	ds	s: Glicina = Λ - 	+ V · Tiempo
<i>Paráme</i> A V	ación de V max	por regresiói	-0,56	1,79 0,019	s: Glicina = $\Lambda$ - $t \cdot ds$ $3,28$	+ V · Tiempo
<i>Paráme</i> A V	ación de V max etros	por regresión	-0,56 0,529	1,79 0,019	s: Glicina = $\Lambda$ - $t \cdot ds$ $3,28$	+ V · Tiempo
<i>Paráme</i> A V	ación de V max etros R = 0,	por regresión 995 621	-0,56 0,529	1,79 0,019	s: Glicina = $\Lambda$ - $t \cdot ds$ $3,28$	+ V · Tiempo

Tabla 3.6.21. Influencia de la temperatura en la actividad enzimática del lodo activado.

Experimento: HG-3-1.

	$\{S\} = 6000$	mg Gelatina/I	SS	$T = 690 \pm 19 \text{ mg/i}$
	$pH = 7.0 \pm$	<b>⊦</b> 0,1	θ	= 10 d
	$T = 10.0 \pm$	Ł 0,1 °C		
				5
	<u>Tiempo (1</u>	<u>nin).</u>	<u>_G</u>	licina (10 · M)
	15			1,9
	30			3,6
	45			6,2
	60 75			6,6 10,6
	90			14,9
	105			13,4
	120			16,0
	135			20,1
	150			20,6
	165 180			24,6 23,8
Determinac	ión de V por	regresión lineal de	los datos cinéticos:	Glicina = $A + V_{max}$ Tiem
Determinac <u>Parámetr</u>		regresión lineal de <u>Valor</u>	los datos cinéticos:	Glicina = $A + V_{max}$ Tiem $\underline{t \cdot ds}$
<u>Parámetr</u>		<u>Valor</u>	<u>ds</u>	<u>ı·ds</u>
<u>Parámetr</u> A V		-0,40	<u>ds</u> 0.79 0.007	$\frac{t \cdot ds}{1,43}$
<u>Parámetr</u> A V	<u>os</u>	-0.40 0,143	<u>ds</u> 0.79 0.007	$\frac{t \cdot ds}{1,43}$
<u>Parámetr</u> A V	R = 0,988	-0.40 0,143	<u>ds</u> 0.79 0.007	$\frac{t \cdot ds}{1,43}$
<u>Parámetr</u> A V	R = 0,988 DS = 1,290 P = 2.3E-09	<u>Valor</u> -0.40 0.143 N =	<u>ds</u> 0.79 0.007	$\frac{t \cdot ds}{1,43}$

Tabla 3.6.22. Influencia de la temperatura en la actividad enzimática del lodo activado.

Experimento: HG-3-2.

<sub>p</sub> H =	7,0 ± 0,1		θ	= 10 d	
Т =	= 10,0 ± 0,1	°C		<u></u>	
	Γiempo (min)		G	licina (10 · M)	
	15	_		1,1	
	30 45			6,1	
	45 60			11,1 8,2	
	75			13,7	
	90			15,7	
	105 120			19,6 16,5	
	135			21,4	
	150 165			22,3	
	10.7			27,7	
	180			28,5	
)eterminación de	180	ón lineal de l	os datos cinéticos:	<del></del> -	V · Tiempo
Determinación de <u>Parámetros</u>	V por regresio	ón lineal de l Valor	os datos cinéticos: ds	<del></del> -	V · Tiempo max
<u>Parámetros</u>	V por regresio			Glicina = A +	V · Tiempo max
<u>Parámetros</u> A	V por regresio	Valor	ds	Glicina = A + $t \cdot ds$	V · Tiempo max
Parámetros A V max	V por regresio	<i>Valor</i> 1,16	1,25 0,011	Glicina = A + $\frac{t \cdot ds}{2,24}$	V · Tiempo
Parámetros  A  V  max  R =	V por regresio	1,16 0,152	1,25 0,011	Glicina = A + $\frac{t \cdot ds}{2,24}$	V · Tiempo
Parámetros  A  V  max  R =  DS =	V por regresion to the second	1,16 0,152	1,25 0,011	Glicina = A + $\frac{t \cdot ds}{2,24}$	V · Tiempo

Tabla 3.6.23. Influencia de la temperatura en la actividad enzimática del lodo activado.

Experimento: HG-3-3.

	[S] = 6000  mg G	Selatina/l		$\Gamma = 690 \pm 19 \text{ mg}$	;/I
	$pH = 7,0 \pm 0,1$		θ	= 10 d	
_	$T = 10.0 \pm 0.1$	°C			
_	Tiempo (min)		G	icina (10 · M)	
	15			2,4	
	30			4,9	
	45			4.8	
	60 75			10,0 9,5	
	90			16,3	
	105			16,8	
	120 135			19,9 18,6	
	150			21,7	
	165			25,1	
	180			28,6	
<u></u>					
Determinac	ión de V por regre	sión lineal de k	os datos cinéticos:	<u> </u>	Tiempo
Determinac <u>Parámetra</u>	ión de V por regre	sión lineal de lo <u>Valor</u>	os datos cinéticos:	<u> </u>	тіетро
	ión de V por regre			Glicina = A + V	Tiempo
<u>Parámetro</u> A	ión de V por regre	<u>Valor</u>	<u>ds</u>	Glicina = A + V max $\underline{t \cdot ds}$	· Tiempo
<u>Parámetro</u> A V	ión de V por regre	<u>Valor</u> -0.18	0,98 0,009	Glicina = $A + V_{max}$ $t : \underline{ds}$ 1,75	Тіетро
<u>Parámetro</u> A V	ión de V por regre	-0.18 0,155	0,98 0,009	Glicina = $A + V_{max}$ $t : \underline{ds}$ 1,75	Тіетро
<u>Parámetro</u> A	ión de V por regres	-0.18 0,155	0,98 0,009	Glicina = $A + V_{max}$ $t : \underline{ds}$ 1,75	· Tiempo

Tabla 3.6.24. Influencia de la temperatura en la actividad enzimática del lodo activado. Experimento: HG-3-4.

[S] =	6000 mg C	Selatina/l	SS	$r = 690 \pm 19$	mg/l
pH =	$7,0 \pm 0,1$		θ	= 10 d	
T =	35,0 ± 0,1	°C			
Tie	empo (min)		G	icina (10 M)	
<u></u>	15			14,9	
	30			28,2	
	45			40,5	
	60 75			58,7 69,2	
	90			81,6	
	105			101,3	
	120 135			112,6 127,7	
	150			143.6	
	165 180			 	
					· · -
Determinación de V	7 por regre				V · Tiempo
Determinación de V Parámetros	/ por regre	sión lineal de le Valor		<u>1 · ds</u>	V · Tiempo max
Parámetros	<sup>7</sup> por regre max				V · Tiempo max
Parámetros A	7 por regre max	Valor	ds	<u>1 · ds</u>	V · Tiempo max
Parámetros A V max	por regre	-0,69 0,952	1,34	1: ds 2,45	V · Tiempo max
Parámetros  A  V  max  R =		-0,69 0,952	1,34 0,014	1: ds 2,45	V · Tiempo max
Parámetros  A  V  max  R =  DS =	0,999	-0,69 0,952	1,34 0,014	1: ds 2,45	V · Tiempo max

Tabla 3.6.25. Influencia de la temperatura en la actividad enzimática del lodo activado.

Experimento: HG-3-5.

	[S] = 60	00 mg Gelatir	na/l		sst =	690 ± 19 mg	/1
	pH = 7	7,0 ± 0,1			θ =	10 d	
	T = 35	5,0 ± 0,1 °C			c		
	Tiempo	(min)			Glicina	1 (10 · M)	
		15				12,3	
		30				28,2	
		45				48,9	
		60 75				80,4	
		90				91,1	
	i	05				103,6	
		20				116,3	
		35 50				132,4 146,2	
		65				161,1	
	1	80					
		<del>,</del>					
Determina		<del>,</del>	lineal de l	os datos ciné	icos: Gli	cina = A + V	Tiempo
Determina <u>Paráme</u>	ación de V max	<del>,</del>	lineal de l		icos: Gli	icina = A + V	Tiempo
	ación de V max	<del>,</del>			<u>ts</u>	icina = A + V	Tiempo
<u>Paráme</u>	ación de V max	<del>,</del>	<u>Valor</u>	!	<u>4s</u>	cina = A + V $\frac{1 \cdot ds}{a}$	Tiempo
<u>Paráme</u> A V	ación de V max	por regresión l	<u>Valor</u> 1,74	2,	<u>4s</u>	$cina = A + V_{max}$ $\frac{t \cdot ds}{3,93}$	Tiempo
<u>Paráme</u> A V	ación de V max	por regresión l	1,74 0,971	2, 0,0	<u>4s</u>	$cina = A + V_{max}$ $\frac{t \cdot ds}{3,93}$	Tiempo
<u>Paráme</u> A V	ación de $V_{max}$ tros $R = 0.9$	por regresión 98 48	1,74 0,971	2, 0,0	<u>4s</u>	$cina = A + V_{max}$ $\frac{t \cdot ds}{3,93}$	Tiempo

Tabla 3.6.26. Influencia de la temperatura en la actividad enzimática del lodo activado.

Experimento: HG-3-6.

[S] =	6000 mg Gela	ttiria/i		$\Gamma = 690 \pm 19$	
pH =	$7,0 \pm 0,1$		θ	= 10 d	
T =	35,0 ± 0,1 °	°C			
_Tie	empo (min)		<u>GI</u>	icina (10 · M)	
_	15			10,5	
	30			31,0	
	45			48,4	
	60 75			65,7 77,3	
	90			97,3	
	105			101,5	
	120 135			115,9 131,4	
	150			131,4	
	165				
	180				<del></del>
Determinación de V		n lineal de los	datos cinéticos:	,,,	V · Tiempo
Determinación de <b>V</b> <u>Parámetros</u>		n lineal de los <u>Valor</u>	datos cinéticos:	,,,	V · Tiempo max
<u>Parámetros</u>				Glicina = A + V	V · Tiempo
<u>Parámetros</u> A		<u>Valor</u>	<u>ds</u>	Glicina = $A + V$ $\underline{t \cdot ds}$	V · Tiempo max
<u>Parámetros</u> A V <sub>max</sub>		<u>Valor</u> 2,44 0,973	<u>ds</u> 3,41	Glicina = $A + V$ $\frac{t \cdot ds}{6,35}$	V · Tiempo
<u>Parámetros</u> A V <sub>max</sub>	por regresió max	<u>Valor</u> 2,44 0,973	<u>ds</u> 3,41 0,040	Glicina = $A + V$ $\frac{t \cdot ds}{6,35}$	V · Tiempo
A V max  R = DS =	por regresió max	<u>Valor</u> 2,44 0,973	<u>ds</u> 3,41 0,040	Glicina = $A + V$ $\frac{t \cdot ds}{6,35}$	V · Tiempo

Tabla 3.6.27. Influencia de la temperatura en la actividad enzimática del lodo activado. Experimento: HG-4-1.

[S] =	6000 mg Gelatina/l	SST =	$702 \pm 17 \text{ mg/l}$
p <b>H</b> =	$7.0 \pm 0.1$	$\theta_{c} =$	10 d
T =	15,0 ± 0,1 °C		
Tie	npo (min)	Glicir	s na (10 · M)
	15		
	30		6,8
	45		10,9
	60 75		16,2
	75 90		21,4 20,6
	105		25,7
	120		31,3
	135 150		32,5
	165		39,3
	180		
			44,2
	por regresión lineat de		licina = A + V · Tiempo
<u>Parámetros</u>	por regresión lineat de nax <u>Valor</u>	ds	licina = A + V · Tiempo  max
<u>Parámetros</u> A	por regresión lineat de	<i>ds</i>	licina = A + V · Tiempo
<u>Parámetros</u> A	por regresión lineat de nax <u>Valor</u>	ds	licina = A + V · Tiempo  max
<i>Parámetros</i> A V	por regresión lineat de  Valor  0,82 0,239	1,10 0,010	licina = $A + V_{max}$ Tiempo $\frac{t \cdot ds}{2.02}$
Parámetros A V max	por regresión lineat de  Valor  0,82 0,239  0,993  N =	1,10 0,010	licina = $A + V_{max}$ Tiempo $\frac{t \cdot ds}{2.02}$
Parámetros  A V max  R =	por regresión lineat de <u>Valor</u> 0,82  0,239  0,993  N = 1,485	1,10 0,010	licina = $A + V_{max}$ Tiempo $\frac{t \cdot ds}{2.02}$

Tabla 3.6.28. Influencia de la temperatura en la actividad enzimática del lodo activado.

Experimento: HG-4-2.

[S] =	6000 mg Gelatina/	וי	SST	$=$ 702 $\pm$ 17 mg	g/l
pH =	7,0 ± 0,1		$\theta_{_{\mathbf{c}}}$	= 10 d	
Τ =	15,0 ± 0,1 °C		C		
T	iempo (min)		Glic	5 ina (10 · M)	
_	15				
	30			10,5	
	45			14,2	
	60			18,5	
	75 90			24,0 22,8	
	105			27,6	
	120			31,7	
	135			33,0	
	150 165			43,0	
	180				
	V por regresión lin				· Tiempo
Determinación de <u>Parámetros</u>	V por regresión lin	Valor	<u>ds</u>	Glicina = $A + V$ max $t \cdot ds$	· Tiempo
	V por regresión lin				Tiempo x
<u>Parâmetros</u>	V por regresión lin	Valor	<u>ds</u>	<u>1: ds</u>	Tiempo x
Parámetros A V max	V por regresión lin	<i>Valor</i> 4,24	1,27 0,013	<u>ı∴ds</u> 2,36	· Tiempo
Parâmetros  A  V  max  R =	V por regresión lin	<u>Valor</u> 4,24 0,227	1,27 0,013	<u>ı∴ds</u> 2,36	· Tiempo x
Parâmetros  A  V  max  R =  DS =	V por regresión line max	<u>Valor</u> 4,24 0,227	1,27 0,013	<u>ı∴ds</u> 2,36	· Tiempo

Tabla 3.6.29. Influencia de la temperatura en la actividad enzimática del lodo activado.

Experimento: HG-4-3.

$pH = 7.0 \pm 0.1$	elatina/l	А	= 10 d	
<del>-</del>		ç	- 10 d	
$T = 15.0 \pm 0.1$	°C			
<u>Tiempo (min)</u>		<u>GI</u>	icina (10 · M)	
15			2,6	
30			5,0	
45			11,2	
60			10,9	
75			17,2	
90 105			23,9 27,4	
120			-7.4	
135			30,5	
150			34,9	
165				
180			 	
·	sión lineal de los d <u>Valor</u>	atos cinéticos:	Glicina = A + V	· Tiempo
Determinación de V por regres max <u>Parámetros</u>				· Tiempo
Determinación de V por regres <u>Parámetros</u> A	<u>Valor</u>	<u>ds</u>	Glicina = $A + V_{ms}$ $\underline{t \cdot ds}$	· Tiempo
Determinación de V por regres <u>Parámetros</u> A	<u>Valor</u> -1,19	<u>ds</u> 1,41	Glicina = $A + V_{max}$ $\frac{t \cdot ds}{2.62}$	· Tiempo
Determinación de V por regres  Parámetros  A V max	<u>Valor</u> -1,19 0,247	<u>ds</u> 1,41	Glicina = $A + V_{max}$ $\frac{t \cdot ds}{2.62}$	· Tiempo
Determinación de $V_{max}$ por regres $\frac{Parámetros}{N}$ A $V_{max}$ $R = 0.986$	<u>Valor</u> -1,19 0,247	<u>ds</u> 1,41	Glicina = $A + V_{max}$ $\frac{t \cdot ds}{2.62}$	· Tiempo

Tabla 3.6.30. Influencia de la temperatura en la actividad enzimática del lodo activado.

Experimento: HG-4-4.

pH = 7.0	mg Gelatina/l ± 0,1	<del>0</del> =	= 702 ± 17 mg/l = 10 d
-	± 0,1 °C	c	
Tr.	(min)	Citat	5 10 340
Tiempo		Gilci	na (10 · M)
15 30			6,0 22,0
45			37,2
60			43,3
75			56,2
90 105			72,9 78,1
120			93.1
135 150			97.1 111,4
165			112,1
180			120,1
		<u>-</u>	
Determinación de V por			Slicina = $A + V_{max}$ Tiempo
	r regresión lineal de los <u>Valor</u> 3,28	datos cinéticos: O <u>ds</u> 3,29	Glicina = $A + V$ Tiempo $\underline{t \cdot ds}$ 5.91
Determinación de V por max <u>Parámetros</u>	<u>Valor</u>	<u>ds</u>	<u>t · ds</u>
Determinación de V por max <u>Parámetros</u> A V	<u>Valor</u> 3,28	<u>ds</u> 3,29 0,030	<u>t : ds</u> 5.91
Determinación de V por max <u>Parámetros</u> A  V <sub>max</sub>	<u>Valor</u> 3.28 0.692	<u>ds</u> 3,29 0,030	<u>t : ds</u> 5.91
Determinación de V por Parámetros  A  V max  R = 0,991	<u>Valor</u> 3.28 0.692	<u>ds</u> 3,29 0,030	<u>t : ds</u> 5.91

Tabla 3.6.31. Influencia de la temperatura en la actividad enzimática del lodo activado. Experimento: HG-4-5.

$pH = 7.0 \pm 0.$	,1	$\theta_{c} = 10 d$	
T = 30,0 ± 0	,1 °C		
<u>Tiempo (min</u> )	)	Glicina (10 · M)	
15		3,6	
30 45		18,4 32.0	
60		32,9 53,3	
75		61,9	
90 105		73,8 88,0	
120		86,0	
135 150		97,8 97,8	
165		106,5	
180		117,6	
		· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	
		datos cinéticos: Glicina = $A + V_{n}$	· Tiempo
<u>Parámetros</u>	<u>Valor</u>	$\underline{ds}$ $\underline{t} \cdot \underline{ds}$	· Tiempo
<u>Parámetros</u> A	<u>Valor</u> 5,93	<u>ds</u> <u>t∴ds</u> 5.24 9,4	· Tiempo nax
<u>Parámetros</u> A	<u>Valor</u>	$\underline{ds}$ $\underline{t} \cdot \underline{ds}$	· Tiempo
<u>Parámetros</u> A V	<u>Valor</u> 5,93		Tiempo nax
<u>Parámetros</u> A V <sub>max</sub>	<i>Valor</i> 5.93 0,655		· Tiempo
$\frac{Par\'{a}metros}{A}$ $V_{max}$ $R = 0.975$	<i>Valor</i> 5.93 0,655		Tiempo

Tabla 3.6.32. Influencia de la temperatura en la actividad enzimática del lodo activado.

Experimento: HG-4-6.

$pH = 7.0 \pm 0$	0,1	θ	= 10 d	
$T = 30,0 \pm 6$	0,1 °C	С		
<u>Tiempo (mi</u>	n)_	Gli	cina (10 · M)	
15			11,8	
30			27.9	
45 60			27,9 42,6	
75			56,7	
90			62,8	
105 120			75,4 85,7	
135			94.8	
150			••	
165			116,8 123,3	
Determinación de V por reg max			Glicina = A + V	Tiempo
	gresión lineal de lo Valor	os datos cinéticos:	Glicina = A + V	Tiempo
Determinación de V por reg max			Glicina = A + V	Tiempo
Determinación de V por reg max <u>Parámetros</u> A	Valor	ds	Glicina = $A + V_{max}$ $\frac{t \cdot ds}{}$	Tiempo
Determinación de V por reg <u>Parámetros</u> A	<i>Valor</i> 2,70	ds 1,78 0,017	Glicina = $A + V_{max}$ $\frac{t \cdot ds}{3.23}$	Tiempo
Determinación de V por reg <u>Parámetros</u> A V max	2.70 0.682	ds 1,78 0,017	Glicina = $A + V_{max}$ $\frac{t \cdot ds}{3.23}$	Tiempo
Determinación de V por reg  Parámetros  A  V max  R = 0,997	2.70 0.682	ds 1,78 0,017	Glicina = $A + V_{max}$ $\frac{t \cdot ds}{3.23}$	Tiempo

Tabla 3.6.33. Influencia de la temperatura en la actividad enzimática del lodo activado.

Experimento: HG-5-1.

	ng Gelatina/l		$\Gamma = 759 \pm 19 \text{ m}$	18/1
$pH = 7.0 \pm$	0,1	θ	= 10 d	
$T = 20.0 \pm$	0,1 °C			
_Tiempo (m	in)_	<u>G</u>	s icina (10 M)	
15			8,7	
30			17,9	
45			19,6	
60 75			24,5 41,4	
90			44,2	
105			48,9	
120			54,3	
135 150			59,1	
165			73,8	
			77.7	
180			76,6	<del></del> -
180 Determinación de V por r	egresión lineal de los	datos cinéticos:		· Tiempo
	egresión lineal de los <u>Valor</u>	datos cinéticos:		· Tiempo
Determinación de V por r			Glicina = A + V	· Tiempo
Determinación de V por re max <u>Parámetros</u> A	<u>Valor</u>	<u>ds</u>	Glicina = $A + V_{m}$	· Tiempo
Determinación de V por re max <u>Parámetros</u> A	<u>Valor</u> 3,83	<u>dx</u> 1,95 0,018	Glicina = $A + V_{m}$ $\frac{t \cdot ds}{3.54}$	· Tiempo
Determinación de V por remax <u>Parámetros</u> A V max	<u>Valor</u> 3,83 0,419	<u>dx</u> 1,95 0,018	Glicina = $A + V_{m}$ $\frac{t \cdot ds}{3.54}$	· Tiempo
Determinación de $V_{max}$ por remax $\frac{Parámetros}{N}$ $R = 0.991$	<u>Valor</u> 3,83 0,419	<u>dx</u> 1,95 0,018	Glicina = $A + V_{m}$ $\frac{t \cdot ds}{3.54}$	· Tiempo

Tabla 3.6.34. Influencia de la temperatura en la actividad enzimática del lodo activado.

Experimento: HG-5-2.

	T = 2	0,0 ± 0,1 °C				
	<u>Tiempo</u>	(min)		O	5   dicina (10 · M)	
		15			2,2	
		30 45			11,7 14,9	
		60			23.3	
		75 90			36,3 37,2	
		105			42,3	
		120			52,3 57,9	
		135 150			62,9	
	1	165 180			77,2	
		<u> </u>			<u> </u>	<del></del>
Determina	nción de V	por regresión line	al de los	datos cinéticos:	Glicina = A +	V · Tiempo
Determina <u>Parámet</u>			al de los Valor	datos cinéticos: ds		V · Tiempo
						V · Tiempo max
<u>Parámet</u>			<u>/alor</u>	ds	<u>t · ds</u>	V · Tiempo max
<u>Parámet</u> A V			<u>/alor</u> 2,89	1,47 0,014		V · Tiempo
<u>Parámet</u> A V	<u>tros</u>		<u>/alor</u> 2,89 9,448	1,47 0,014		V · Tiempo max
<u>Parámet</u> A V	R = 0.9		<u>/alor</u> 2,89 9,448	1,47 0,014		V · Tiempo

Tabla 3.6.35. Influencia de la temperatura en la actividad enzimática del lodo activado.

Experimento: HG-5-3.

	$pH = 7,0 \pm 0$	v.1	θ	= 10 d	
	_		, and the second	c	
	$T = 20,0 \pm 0$	,1 ℃		· <u></u>	
	<u> Tiempo (min</u>	)	G	s Slicina (10 · M)	
		<u>.                                    </u>			
	15 30			7,1 11,9	
	45			18,5	
	60			32,0	
	75			43,0	
	90 105			49,8 52.1	
	105 120			52,1 62,0	
	135			61,1	
	150			62,4	
	165 180			76,1 77,3	
					<del>-</del>
Determina	ación de V por reg	resión lineal de i	los datos cinéticos:	Glicina = A + V · max	Tiempo
Determina <u>Paráme</u>		resión lineal de i Valor	los datos cinéticos: ds	Glicina = $A + V_{max}$ $\underline{t \cdot ds}$	Tiempo
					Tiempo
<u>Paráme</u>		<u>Valor</u>	<u>ds</u>	<u>t · ds</u>	Tiempo
<u>Paráme</u> A V		3,79	3,17 0,029	<u>t·ds</u> 5,7	Tiempo
<u>Paráme</u> A V	tros	<u>Valor</u> 3,79 0,434	3,17 0,029	<u>t·ds</u> 5,7	Tiempo
<u>Paráme</u> A V	R = 0,979	<u>Valor</u> 3,79 0,434	3,17 0,029	<u>t·ds</u> 5,7	Tiempo

Tabla 3.6.36. Influencia de la temperatura en la actividad enzimática del lodo activado.

Experimento: HG-5-4.

	6000 mg Gelatina/l	$SST = 759 \pm 19 \text{ mg/l}$
pH =	$7,0 \pm 0,1$	$\theta_{c} = 10 d$
T =	25,0 ± 0,1 °C	
Tie	<u>mpo (min)</u>	Glicina (10 · M)
	15	6,5
	30	19,2
	45	30,5
	60 75	44,0 52,3
	90	55,9
	105 120	67,4 77,1
	135	91,7
	150	92,4
	165 180	101,7 108,2
Determinación de V	nor regresión lineal d	
	por regresión lineal de	e los datos cinéticos: Glicina = A + V Tiempo
Determinación de V 1 Parámetros	<u>Valor</u>	e los datos cinéticos: Glicina = $A + V_{max}$ Tiempo $\underline{ds} \qquad \underline{t \cdot ds}$
<u>Parámetros</u>		e los datos cinéticos: Glicina = $A + V_{max}$ Tiempo $\underline{ds} \qquad \underline{t \cdot ds}$
<u>Parámetros</u>	<u>Valor</u>	e los datos cinéticos: Glicina = A + V Tiempo $\frac{ds}{2.32} \qquad \frac{t \cdot ds}{4.17}$
Parámetros A V max	<u>Valor</u> 2,72	e los datos cinéticos: Glicina = A + V Tiempo $\frac{ds}{max} = \frac{t \cdot ds}{4.17}$ $0.021 \qquad 0.038$
Parámetros A V max	2.72 0.610 0,994 N =	e los datos cinéticos: Glicina = A + V Tiempo $\frac{ds}{max} = \frac{t \cdot ds}{4.17}$ $0.021 \qquad 0.038$
Parámetros  A  V  max  R =	0,994 N = 3,772	e los datos cinéticos: Glicina = A + V Tiempo $\frac{ds}{max} = \frac{t \cdot ds}{4.17}$ $0.021 \qquad 0.038$

Tabla 3.6.37. Influencia de la temperatura en la actividad enzimática del lodo activado. Experimento: HG-5-5.

	_	Gelatina/l		$t = 759 \pm 19 \text{ mg}$	g/1
	$pH = 7,0 \pm 0,$	1	θς	= 10 d	
	$T = 25,0 \pm 0,$	1 °C			
				5	
	<u>Tiempo (min)</u>		<u>[G]</u>	<u>cina (10 · M)</u>	
	15 30			7,9 20,1	
	30 45			20,1 32,2	
	60			40,1	
	75			57,0	
	90			65,2	
	105			75,1	
	120 135			74,9 83,6	
	150				
	165				
	180			••	
Determinac	ción de V por regre	esión lineal de los c	latos cinéticos:	Glicina = A + V ma	· Tiempo
Determinad <u>Parámetr</u>	ción de V por regre	esión lineal de los o <u>Valor</u>	latos cinéticos:	Glicina = $A + V_{ma}$	· Tiempo
<u>Parámetr</u>	ción de V por regre				· Tiempo
<u>Parámetr</u> A	ción de V por regre	<u>Valor</u>	<u>ds</u>	<u>ı:ds</u>	· Tiempo
<i>Parámett</i> A V	ción de V por regre	<u>Valor</u> 2,50	<u>ds</u> 3,54 0,042	<u>ı:ds</u> 6,58	· Tiempo
<i>Parámett</i> A V	ción de V por regre max	2,50 0,642	<u>ds</u> 3,54 0,042	<u>ı:ds</u> 6,58	· Tiempo
<u>Parámetr</u> A V	ción de V por regresos  R = 0.985	2,50 0,642	<u>ds</u> 3,54 0,042	<u>ı:ds</u> 6,58	· Tiempo

Tabla 3.6.38. Influencia de la temperatura en la actividad enzimática del lodo activado.

Experimento: HG-5-6.

[S] =	6000 mg Gelatina/l	$SST = 759 \pm 19 \text{ mg/s}$	/1
pH =	$7,0 \pm 0,1$	$\theta_{c} = 10 d$	
T =	25,0 ± 0,1 °C		
Tiem	ipo (min)	Glicina (10 · M)	
	15	9,1	
	30	26.8	
	45	38,5	
	60	38,0	
	75	47.1	
	90 105	60,9 70,5	
	120	81.2	
	135	87.8	
	150	96,5	
	165 180	114,3 115,2	
		· <del></del>	
	por regresión lineal de la	os datos cinéticos: Glicina = A + V max	Tiempo
Determinación de V ma <u>Parámetros</u>		· <del></del>	Tiempo
	por regresión lineal de la	os datos cinéticos: Glicina = A + V max	Tiempo
<u>Parámetros</u>	por regresión lineal de lo x <u>Valor</u>	os datos cinéticos: Glicina = A + V $\frac{ds}{ds}$	Tiempo
<u>Parámetros</u> A V	por regresión lineal de la <u>Valor</u> 3,64 0,634	os datos cinéticos: Glicina = A + V max $\frac{ds}{2.43} = \frac{t \cdot ds}{4.37}$ $0.022 = 0.040$	Tiempo
Parámetros  A  V  max  R = 0	por regresión lineal de la <u>Valor</u> 3,64 0,634	os datos cinéticos: Glicina = A + V max $\frac{ds}{2.43} = \frac{t \cdot ds}{4.37}$ $0.022 = 0.040$	Tiempo
Parámetros  A  V  max  R = 0	por regresión lineal de la <u>Valor</u> 3,64 0,634 0,994 N = 3,955	os datos cinéticos: Glicina = A + V max $\frac{ds}{2.43} = \frac{t \cdot ds}{4.37}$ $0.022 = 0.040$	Tiempo

## III.6.3. Efecto de la edad del lodo.

En la tercera etapa de la experimentación se obtienen los datos necesarios para determinar la influencia de la edad del lodo sobre su actividad enzimática.

Para ello, utilizando gelatina como sustrato, y trabajando a pH 7 y temperatura de 25°C, se han ensayado dos lodos de edad diferente, concretamente de 10 y 14 días. Cada ensayo se ha replicado en cuatro ocasiones utilizando lodo procedente de las purgas de las dos unidades de tratamiento biológico realizadas en días diferentes; a la vez, en cada ocasión, se han realizado tres réplicas con alícuotas procedentes del mismo volumen de purga, por lo que se dispone de doce experimentos para cada uno de los dos tipos de lodos activados ensayados. Los resultados experimentales obtenidos quedan recogidos en las tablas 3.6.39 a 3.6.62, en las que, además de la evolución de la concentración de grupos amino libres con el tiempo, se recoge el resultado del cálculo de la velocidad máxima específica de hidrólisis (V<sub>max,e</sub>) de la misma forma que se hizo en el apartado III.6.2. La nomenclatura utilizada en este caso coincide con la de aquél.

Tabla 3.6.39. Influencia de la edad del lodo activado en su actividad enzimática.

Experimento: HG-6-1.

	[S] = 6000  mg G			'= 779 ± 1	_
	$pH = 7.0 \pm 0.1$		θς	= 10 d	
	$T = 25,0 \pm 0,1$	°C			
	<u>Tiempo</u> (min)		<u>GI</u>	5 icina (10 · M)	_
	15			3,6	
	30			13,4	
	45			22,6	
	60 75			31,5 38,5	
	75 90			56,4	
	105			57,3	
	120			60,1	
	135 150			70,8	
	150 165			 	
	180			<del></del>	
<u>-</u>				<del>-</del>	
)eterminac	ción de V por regre	sión lineal de los d	atos cinéticos:	Glicina = A +	V · Tiempo
Determinac <u>Parámetr</u>		sión lineal de los d <u>Valor</u>	atos cinéticos: ds	Glicina = A +	V · Tiempo
<u>Parámeti</u>					V · Tiempo
<u>Parámeti</u> A		<u>Valor</u>	ds	<u>t · ds</u>	V · Tiempo
<i>Parámeti</i> A V		<u>Valor</u> -2,58	2,84 0,034	1 · ds 5,28	V · Tiempo
<i>Parámeti</i> A V	ros	-2,58 0,559	2,84 0,034	1 · ds 5,28	V · Tiempo
<i>Parámeti</i> A V	R = 0,988	-2,58 0,559	2,84 0,034	1 · ds 5,28	V · Tiempo

Tabla 3.6.40. Influencia de la edad del lodo activado en su actividad enzimática.

Experimento: HG-6-2.

	[S] = 6000  mg  C	Gelatina/l	SS	$T = 779 \pm 19 \text{ m}$	g/l
	$pH = 7,0 \pm 0,1$		θ	= 10 d	
	$T = 25,0 \pm 0,1$	°C			
	Tiempo (min)		GI	s icina (10 · M)	
	15			<u></u>	
	30			**	
	45 60			29,4 38,2	
	75				
	90			58,4	
	105 120			66.2 70,8	
	135			••	
	150 165			85,6	
	180			104,0	
<b>Determinac</b>	ión de V por regre	esión lineal de los (	datos cinéticos:	Glicina = A + V	· Tiempo
Determinaci <u>Parámetra</u>		esión lineal de los o	datos cinéticos:	Glicina = A + $V_{ms}$	· Tiempo
<u>Parámetro</u>					· Tiempo
<u>Parámetra</u> A		<u>Valor</u>	<u>ds</u>	<u>ı · ds</u>	· Tiempo
<i>Parámetrs</i> A V		<u>Valor</u> 6,87	2,24 0,019	<u>ı·ds</u> 4,36	· Tiempo
<u>Parámetro</u> A V	<u>0</u> 8	6,87 0,539	2,24 0,019	<u>ı·ds</u> 4,36	· Tiempo
<u>Parámetro</u> A V	os R = 0,997	6,87 0,539	2,24 0,019	<u>ı·ds</u> 4,36	· Tiempo

Tabla 3.6.41. Influencia de la edad del lodo activado en su actividad enzimática.

Experimento: HG-6-3.

• •	Gelatina/l	SST	$=$ 779 $\pm$ 19 mg	g/l
$pH = 7.0 \pm 0,$	1	θ	= 10 d	
$T = 25,0 \pm 0,$	1 °C			
_Tiempo (min)		Gli	cina (10 · M)	
15	•			
30			17,5	
45			 37,4	
60 75			51, <del>4</del> 	
90			49,4	
105 120			58,0 67,4	
135				
150 165			82,8	
180			99,1	•
	-			
max			ma	· Tiempo
Determinación de V por regr max <u>Parámetros</u>	esión lineal de los d <u>Valor</u>	latos cinéticos:	Glicina = A + V ma	· Tiempo
max <u>Parámetros</u>			ma	· Tiempo
mux <u>Parámetros</u> A	<u>Valor</u>	<u>ds</u>	<u>t∵ds</u>	· Tiempo
mux <u>Parámetros</u> A	<u>Valor</u> 2,58	1,39 0,012		· Tiempo
mux <u>Parámetros</u> A V max	<u>Valor</u> 2,58 0,535	1,39 0,012		· Tiempo
$\frac{Parámetros}{A}$ $V_{max}$ $R = 0,999$	<u>Valor</u> 2,58 0,535	1,39 0,012		· Tiempo

Tabla 3.6.42. Influencia de la edad del lodo activado en su actividad enzimática. Experimento: HG-6-4.

$pH = 7.0 \pm 0.1$		θ	= 14 d	
$T = 25,0 \pm 0,1$		c		
	, <del></del>	CI	cina (10 · M)	
<u>Tiempo (min)</u>		<u>.Gii</u>		
15 30				
45			16,8	
60			23,7	
75 90			26,7 37,0	
105			45,4	
120			49,7	
135			55,0	
150 165			61,1 69,5	
180				
Determinación de V por regre	sión lineal de los d	atos cinéticos:	Glicina = A + V	' · Tiempo
Determinación de V por regre max <u>Parámetros</u>	esión lineal de los d	atos cinéticos: <u>ds</u>	Glicina = $A + V$	' · Tiempo
<u>Parámetros</u>				' · Tiempo max
<u>Parámetros</u> 4	<u>Valor</u>	<u>ds</u>	<u>t · ds</u>	' · Tiempo max
<u>Parámetros</u> A V	<u>Valor</u> -3,00	<u>ds</u> 1,61	1. ds 3,00	/ · Tiempo max
<u>Parámetros</u> A V max	-3,00 0,436	<u>ds</u> 1,61	1. ds 3,00	/ · Tiempo mux
A $V_{\text{max}}$ $R = 0,996$	-3,00 0,436	<u>ds</u> 1,61	1. ds 3,00	/ · Tiempo max

Tabla 3.6.43. Influencia de la edad del lodo activado en su actividad enzimática.

Experimento: HG-6-5.

	6000 mg Gelatina/l	$SST = 365 \pm 22 \text{ mg/l}$	
pH =	$7,0 \pm 0,1$	$\theta_{c} = 14 d$	
T =	25,0 ± 0,1 °C		
Tie	empo (min)	Glicina (10 · M)	
_11	- ·		
	15 30	 11,1	
	45	19,4	
	60	23,8	
	75	31,2	
	90 1 <b>0</b> 5	41,3 48.7	
	120	48,7 51,3	
	135	55,7	
	150	66,0	
	165 180	 •-	
			<del> \</del>
		os datos cinéticos: Glicina = A + V · Tien	npo
Determinación de V	y por regresión lineal de lo max <u>Valor</u>	os datos cinéticos: Glicina = A + V $\cdot$ Tien $\frac{ds}{s}$	npo
			npo
<u>Parámetros</u>	<u>Valor</u>	<u>ds</u> <u>1: ds</u>	npo
Parámetros A V max	<u>Valor</u> -1,38	$\frac{ds}{1.81}$ $\frac{1 \cdot ds}{3.37}$ 0.018 0.034	npo
Parámetros A V max	\textstyle \frac{Vator}{-1,38} \\ 0,446 \\ \textstyle \	$\frac{ds}{1.81}$ $\frac{1 \cdot ds}{3.37}$ 0.018 0.034	npo
Parámetros  A  V  max  R =  DS =	\textstyle \frac{Vator}{-1,38} \\ 0,446 \\ \textstyle \	$\frac{ds}{1.81}$ $\frac{1 \cdot ds}{3.37}$ 0.018 0.034	npo

Tabla 3.6.44. Influencia de la edad del lodo activado en su actividad enzimática. Experimento: HG-6-6.

[S] =	6000 mg Ge	elatina/l	SS	$T = 365 \pm 22 \text{ mg/l}$	
pH =	7,0 ± 0,1		θ	= 14 d	
T =	25,0 ± 0,1	°C		·	
Ti	iempo (min)	- <del>-</del>	G	icina (10 · M)	
	15				
	30			••	
	45			22,1	
	60 75			26,3 33,4	
	90				
	105			••	
	120 135			58,3	
	150			64,6	
	165 180			72,3 81,8	
Determinación de \	V por regres	ión lineal de los	datos cinéticos:	Glicina = $A + V \cdot T$	iempo
Determinación de V	V por regres	ión lineal de los <u>Valor</u>	datos cinéticos:	Glicina = $A + V_{max} \cdot T$	iempo
<u>Parámetros</u>	V por regres				iempo
<u>Parámetros</u> A	V por regres	<u>Valor</u>	<u>ds</u>	<u>ı - ds</u>	iempo
<u>Parámetros</u> A V <sub>max</sub>	V por regres.	<u>Valor</u> 0,93	<u>ds</u> 1,59 0,013	<u>1 · ds</u> 3,09	iempo
<u>Parámetros</u> A  V  max  R =		<u>Valor</u> 0,93 0,435	<u>ds</u> 1,59 0,013	<u>1 · ds</u> 3,09	iempo
Parâmetros  A  V max  R = DS =	0,998	<u>Valor</u> 0,93 0,435	<u>ds</u> 1,59 0,013	<u>1 · ds</u> 3,09	iempo

Tabla 3.6.45. Influencia de la edad del lodo activado en su actividad enzimática.

Experimento: HG-7-1.

$pH = 7,0 \pm 0,$	1	θ	= 10 d	
<u>-</u>		c		
$T = 25,0 \pm 0,$	1 °C			
<u>Tiempo (min)</u>		Gli	s cina (10 · M)	
15	-			
30			16,9	
45			26,8	
60				
75 90			42,4 55,3	
105			59,0	
120			70,9	
135				
150 165			85,5 95,3	
180			103,0	
			· 	
	esión lineal de los d	atos cinéticos:		· Tiempo
eterminación de V por regr			Glicina = A + V	· Tiempo
eterminación de V por regr max	<u>Valor</u>	<u>ds</u>	Glicina = $A + V_{n}$	· Tiempo
eterminación de V por regr max <u>Parámetros</u>	<u>Valor</u> 0,75	<u>ds</u> 1,32	Glicina = $A + V_{n}$ $\frac{t \cdot ds}{2,45}$	· Tiempo nax
eterminación de V por regr max <u>Parámetros</u>	<u>Valor</u>	<u>ds</u>	Glicina = $A + V_{n}$	· Tiempo
eterminación de V por regr <u>Parámetros</u> A 7 max	<u>Valor</u> 0,75 0,571	<u>ds</u> 1,32	Glicina = $A + V_{n}$ $\frac{t \cdot ds}{2,45}$	· Tiempo
Peterminación de V por regr Parámetros A V max R = 0,999	<u>Valor</u> 0,75	<u>ds</u> 1,32	Glicina = $A + V_{n}$ $\frac{t \cdot ds}{2,45}$	· Tiempo
Peterminación de V por regr Parámetros  A V max  R = 0,999  DS = 1,657	<u>Valor</u> 0,75 0,571	<u>ds</u> 1,32	Glicina = $A + V_{n}$ $\frac{t \cdot ds}{2,45}$	· Тіетро
Peterminación de V por regr Parámetros A W max R = 0,999	<u>Valor</u> 0,75 0,571	<u>ds</u> 1,32	Glicina = $A + V_{n}$ $\frac{t \cdot ds}{2,45}$	· Tiempo

Tabla 3.6.46. Influencia de la edad del lodo activado en su actividad enzimática. Experimento: HG-7-2.

	G] = 6000 mg G			'= 789 ± 19 1	ng/i
pΙ	$H = 7,0 \pm 0,1$		$\theta_{\mathfrak{c}}$	= 10 d	
	$\Gamma = 25,0 \pm 0,1$	°C			
	Tiempo (min)		GI	cina (10 · M)	
	15				
	30			19,7	
	45 60			30,0	
	60 75			34,9 48,7	
	90			55,8	
	105			64,5	
	120 135			71,7 82,2	
	150				
	165				
	180			106,8	·
				<del>-</del>	
Determinación	de V por regres	sión lineal de los d	latos cinéticos:	Glicina = $A + V$	· Tiempo
Determinación  Parámetros	de V por regree	sión lineal de los d <u>Valor</u>	latos cinéticos:	Glicina = $A + V_{g}$	· Tiempo
<u>Parámetros</u>	de V por regree			r:	· Tiempo nax
<u>Parámetros</u> A	de V por regres	<u>Valor</u>	<u>ds</u>	<u>t·ds</u>	· Tiempo nax
<i>Parámetros</i> A V <sub>max</sub>	de V por regres	<u>Valor</u> 2,89	1,21 0,012	<u>t·ds</u> 2,26	· Tiempo
<i>Parámetros</i> A V <sup>max</sup>	max	<u>Valor</u> 2,89 0,581	1,21 0,012	<u>t·ds</u> 2,26	· Tiempo
Parámetros  A  V max  I	max  R = 0,999	<u>Valor</u> 2,89 0,581	1,21 0,012	<u>t·ds</u> 2,26	· Tiempo

Tabla 3.6.47. Influencia de la edad del lodo activado en su actividad enzimática. Experimento: HG-7-3.

pi	$H = 7,0 \pm 0,1$		θ	= 10 d	
·-	$T = 25,0 \pm 0,1$	°C			
<del></del>	<u>Tiempo (min)</u>		Gli	s cina (10 · M)	
	15				
	30			11,4	
	45 60			 34,5	
	60 75			34,3 45,4	
	90			55,5	
	105			65,7	
	120			67,8	
	135 150			81,5	
	165			90,3	
	180			103,6	
					·
Determinación	ı de V por regres	sión lineal de los d	atos cinéticos:	Glicina = A + V	' Tiempo
Determinación <u>Parámetros</u>	ı de V por regres	sión lineal de los d	atos cinéticos:	Glicina = A + V	' · Tiempo
<u>Parámetros</u>	i de V por regre: max				' · Tiempo max
<u>Parámetros</u> A	i de V por regre:	<u>Valor</u>	<u>ds</u>	<u>t: ds</u>	7 · Tiempo max
<u>Parámetros</u> A V <sub>max</sub>	n de V por regres max  R = 0,991	<u>Valor</u> 0,36	<u>ds</u> 3,49	<u>ı·ds</u> 6,48	7 · Tiempo max
Parámetros A V max	max	<u>Valor</u> 0,36 0,567	<u>ds</u> 3,49	<u>ı·ds</u> 6,48	7 · Tiempo
Parámetros A V max I D	max R = 0,991	<u>Valor</u> 0,36 0,567	<u>ds</u> 3,49	<u>ı·ds</u> 6,48	7 · Tiempo

Tabla 3.6.48. Influencia de la edad del lodo activado en su actividad enzimática. Experimento: HG-7-4.

	g Gelatina/l		$\Gamma = 391 \pm 32 \text{ mg}$	/1
$pH = 7.0 \pm 6$	0,1	θ	= 14 d	
T = 25,0 ±	0,1 °C			
<u>Tiempo (mi</u>	<u>n)</u>	<u>.G</u> l	5 icina (10 · M)	
15		-		
30			*-	
45			 ·	
60 75			23,4 30,8	
90			37,0	
105			42,3	
120			50,1	
135 150			56,3 61,7	
165			71,6	
180	<del></del>		<del>-</del>	
Determinación de V por re			Glicina = A + V	Tiempo
Determinación de V por reg max	<u>Valor</u>	<u>ds</u>	Glicina = A + V max $\underline{t \cdot ds}$	Tiempo
Determinación de V por req		<u>ds</u> 1,32	Glicina = A + V $\frac{t \cdot ds}{2.5}$	Tiempo
Determinación de V por reg max	<u>Valor</u>	<u>ds</u>	Glicina = A + V $\frac{t \cdot ds}{2.5}$	Tiempo
Determinación de V por reg max <u>Parámetros</u> A	<u>Valor</u> -3,14	1,32 0,011	Glicina = A + V $\frac{t \cdot ds}{2.5}$	Tiempo
Determinación de V por reg <u>Parámetros</u> A V max	-3,14 0,443	1,32 0,011	Glicina = A + V $\frac{t \cdot ds}{2.5}$	Tiempo
Determinación de V por reg <u>Parámetros</u> A  V max  R = 0,998	-3,14 0,443	1,32 0,011	Glicina = A + V $\frac{t \cdot ds}{2.5}$	Tiempo

Tabla 3.6.49. Influencia de la edad del lodo activado en su actividad enzimática.

Experimento: HG-7-5.

$[S] = \epsilon$	6000 mg Gelatina/l	SST :	$=$ 391 $\pm$ 32 mg/l
pH =	$7,0 \pm 0,1$	θ <sub>c</sub> :	= 14 d
T = :	25,0 ± 0,1 °C		
Tiem	00 (min)	Glic	5 ina (10 · M)
	15		
	30		
	45		19,6
	60 75		
	90		
	105		44,3
	120 135		51,8 59,5
	150		66,4
	165		72,9
	180		79.2
	180		79,2
Determinación de V	por regresión lineal de los	datos cinéticos:	
Determinación de V max <u>Parámetros</u>		datos cinéticos: (	
<u>Parámetros</u>	por regresión lineal de los		Glicina = $A + V$ · Tiem
<u>Parámetros</u> A	por regresión lineal de los Valor	ds	Glicina = A + V · Tiem 
<u>Parámetros</u> A V	por regresión lineal de los  Valor -1,29 0,447	1,03 0,008	Glicina = $A + V_{max}$ Tiem $\frac{t \cdot ds}{1,99}$
Parámetros A V max	por regresión lineal de los  Valor -1,29 0,447  N =	1,03 0,008	Glicina = $A + V_{max}$ Tiem $\frac{t \cdot ds}{1,99}$
$\frac{Par\acute{a}metros}{A}$ $V_{max}$ $R = 0$	por regresión lineal de los  Valor  -1,29  0,447  N =  834	1,03 0,008	Glicina = $A + V_{max}$ Tiem $\frac{t \cdot ds}{1,99}$

Tabla 3.6.50. Influencia de la edad del lodo activado en su actividad enzimática.

Experimento: HG-7-6.

	≈ 6000 mg C			$\Gamma = 391 \pm 32 \text{ mg/}$	1
pH =	≈ 7,0 ± 0,1		θ	= 14 d	
T =	≈ 25,0 ± 0,1	°C			
	<u> Fiempo (min)</u>			icina (10 M)	
<del></del>	15			••	
	30			10,3	
	45			15,4	
	60 75				
	90			37,2	
	105			41,5	
	120				
	135 150			58,7 63,3	
	165			67,0	
	180			74,3	
	<del>-</del>			- <del></del>	<del></del> _
eterminación de	V por regre	sión lineal de los	datos cinéticos:	Glicina = A + V	Tiempo
eterminación de	V por regre	sión lineal de los <u>Valor</u>	datos cinéticos:	Glicina = $A + V$ max $\underline{t \cdot ds}$	Tiempo
<u>Parámetros</u>	V por regre				Tiempo
<u>Parámetros</u>	V por regre	<u>Valor</u>	<u>ds</u>	<u>t · ds</u>	Tiempo
<u>Parámetros</u> A Max	V por regre	<u>Valor</u> -2,92	1,47 0,012	<u>t·ds</u> 2,79	Tiempo
<u>Parámetros</u> A / max R =		<u>Valor</u> -2,92 0,435	1,47 0,012	<u>t·ds</u> 2,79	Tiempo
Parámetros  A V max  R = DS =	· 0,998	<u>Valor</u> -2,92 0,435	1,47 0,012	<u>t·ds</u> 2,79	Tiempo

Tabla 3.6.51. Influencia de la edad del lodo activado en su actividad enzimática.

Experimento: HG-8-1.

[S] =	6000 mg Gelatina/l	$SST = 618 \pm 19 \text{ mg/l}$	
pH =	$7,0 \pm 0,1$	$\theta_{c} = 10 d$	
T =	25,0 ± 0,1 °C		
		5	
Tien	npo (min)	Glicina (10 · M)	
	15		
	30 45	10.9	
	60	19,8 27,0	
	75	32,9	
	90	41,4	
	105	48,2	
	120	52,9	
	135 150	60,1 64,3	
	165	72,0	
	180	76,7	
Date to the de V			
	por regresión lineal de	los datos cinéticos: Glicina = A + V max	Tiempo
Determinación de V m: <u>Parámetros</u>		los datos cinéticos: Glicina = A + V max	Tiempo
	por regresión lineal de	los datos cinéticos: Glicina = A + V max	Tiempo
<u>Parámetros</u>	por regresión lineal de ax	los datos cinéticos: Glicina = A + V max $\frac{ds}{1,07} = \frac{t \cdot ds}{1,96}$	Tiempo
<u>Parámetros</u> A V	por regresión lineal de <u>Valor</u> 2,03 0,422	los datos cinéticos: Glicina = A + V max $ \frac{ds}{1,07} = \frac{1 \cdot ds}{1,96} $ $ 0,009 = 0,016 $	Tiempo
Parámetros A V max	por regresión lineal de  Valor  2,03  0,422  0,998  N =	los datos cinéticos: Glicina = A + V max $ \frac{ds}{1,07} = \frac{1 \cdot ds}{1,96} $ $ 0,009 = 0,016 $	Tiempo
Parámetros  A  V  max  R = 0	por regresión lineal de <u>Valor</u> 2,03  0,422  0,998  N =	los datos cinéticos: Glicina = A + V max $ \frac{ds}{1,07} = \frac{1 \cdot ds}{1,96} $ $ 0,009 = 0,016 $	Tiempo

Tabla 3.6.52. Influencia de la edad del lodo activado en su actividad enzimática. Experimento: HG-8-2.

[S] = 0	6000 mg Gelatina/l	SST ≈	618 ± 19 mg/l
pH =	7,0 ± 0,1	θ =	10 d
T =	25,0 ± 0,1 °C	·	
Tiem	00 (min)	_Glicina	(10 · M)
-	15		••
	30		13,2
	45		15,8
	60 75		27,3 29,9
	90		36,6
	105		47,3
	120		49,6
	135 150		58,8 63,3
	165		70,8
	180		
			<del></del>
Determinación de V		los datos cinéticos: Glic	
Determinación de V max <u>Parámetros</u>			$ina = A + V \cdot Tiempo$ $\underline{t \cdot ds}$
	por regresión lineal de		ina = A + V · Tiempo
<u>Parámetros</u>	por regresión lineal de <u>Valor</u>	<u>ds</u> 1,53	$ina = A + V \cdot Tiempo$ $\underline{t \cdot ds}$
<i>Parámetros</i> <b>A</b> V	por regresión lineal de <u>Valor</u> -1,21 0,436	<u>ds</u> 1,53	ina = $A + V_{max}$ Tiempo  1: ds  2,8
Parámetros A V max	valor -1,21 0,436  N =	1,53 0,014	ina = $A + V_{max}$ Tiempo  1: ds  2,8
$\frac{Par\acute{a}metros}{A}$ $V_{max}$ $R = 0$	yalor -1,21 0,436  N = 9953	1,53 0,014	ina = $A + V_{max}$ Tiempo  1: ds  2,8

Tabla 3.6.53. Influencia de la edad del lodo activado en su actividad enzimática.

Experimento: HG-8-3.

	[S] = 6000 mg C			$\Gamma = 618 \pm 19$	mg/I
1	$pH = 7,0 \pm 0,1$		9	= 10 d	
	$T = 25,0 \pm 0,1$	°C			
	<u>Tiempo (min)</u>		G	icina (10 · M)	
	15				
	30				
	45 60			19,8	
	60 75			30,1 37,9	
	90			44,6	
	105			50,7	
	120			57,3	
	135 150			59,2 65,9	
	165			72,6	
	180			83,5	
Determinació	on de V por regre	sión lineal de le	os datos cinéticos:	Glicina = A + V	· Tiempo
Determinació Parámetros	max	sión lineal de le Valor	os datos cinéticos:	Glicina = $A + N$	√ · Tiempo wax
<u>Parámetros</u>	max				√ · Tiempo max
<i>Parámetros</i> A	max	<u>Valor</u>	<u>ds</u>	<u>1 · ds</u>	· Tiempo max
<i>Parámetros</i> A V	max	<i>Valor</i> 3,92	2,18 0,018	1 · ds 4,00	√ · Tiempo max
<i>Parámetros</i> A V max	max 5	3,92 0,429	2,18 0,018	1 · ds 4,00	√ · Tiempo max
<i>Parámetros</i> A V max	R = 0,993	3,92 0,429	2,18 0,018	1 · ds 4,00	√ · Tiempo max

Tabla 3.6.54. Influencia de la edad del lodo activado en su actividad enzimática.

Experimento: HG-8-4.

[3	] = 6000 mg	Gelatina/l	SS	r = 663 <u>±</u> 1-	4 mg/l
pH	$1 = 7.0 \pm 0$	,1	θ	= 14 d	
1	$\Gamma = 25,0 \pm 0,$	,1 °C			
	Tiempo (min)	<u> </u>	G	icina (10 · M)	
	15				
	30			29,5	
	45 60			38,5 47,8	
	75			47,8 71,1	
	90			85,7	
	105			96,0	
	120 135			103,3 114,6	
	150			119,4	
	165 180			144,9	
	• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •				
<b>Determinación</b>		esión lineal de l	os datos cinéticos:	Glicina = A +	V · Tiempo
Determinación			os datos cinéticos:	Glicina = A +	V Tiempo
Determinación <u>Parámetros</u>		resión lineal de l <u>Valor</u>	os datos cinéticos:	Glicina = A + $I \cdot ds$	V · Tiempo
<u>Parámetros</u>					V Tiempo
<u>Parámetros</u>		<u>Valor</u>	<u>ds</u>	<u>1 : ds</u>	V Tiempo max
Parámetros A V max		<u>Valor</u> 4,49	<i>ds</i> 4,29	<u>1 · ds</u> 7,87	V Tiempo
Parámetros A V max	de V por regr	<u>Valor</u> 4,49 0,827	4,29 0,040	<u>1 · ds</u> 7,87	V · Tiempo
<u>Parámetros</u> A V max R	de V por regr max	<u>Valor</u> 4,49 0,827	4,29 0,040	<u>1 · ds</u> 7,87	V · Tiempo

Tabla 3.6.55. Influencia de la edad del lodo activado en su actividad enzimática.

Experimento: HG-8-5.

	[S] = 6000  mg C	ielatina/l	SST	$=$ 663 $\pm$ 14 m	g/l
	$pH = 7,0 \pm 0,1$		θ	= 14 d	
_	$T = 25,0 \pm 0,1$	°C			
	Tiempo (min)		Gl	scina (10 · M)	
	15				
	30			20,3	
	45 60			36,3 48,0	
	75			62,3	
	90			73,6	
	105 120			84,1 96,1	
	135			106,7	
	150			126,9	
	165 180				
Determina	ción de V por regre	sión lineal de los	datos cinéticos:	Glicina = A + V	· Tiempo
Determina <u>Parámet</u>	max	sión lineal de los <u>Valor</u>	datos cinéticos:	Glicina = A + $V_{\text{ms}}$ $\underline{t \cdot ds}$	· Tiempo
<u>Parámet</u>	max			me	· Tiempo
<u>Parámet</u> A	max	<u>Valor</u>	<u>ds</u>	ine <u>i ∙ ds</u>	· Tiempo
<i>Parámei</i> A V	max	<u>Valor</u> -2,86	<u>ds</u> 2,15 0,022	1 · ds 4,00	· Tiempo
<i>Parámei</i> A V	max <u>Pros</u>	<u>Valor</u> -2,86 0,840	<u>ds</u> 2,15 0,022	1 · ds 4,00	· Tiempo
<i>Parámei</i> A V	R = 0.998	<u>Valor</u> -2,86 0,840	<u>ds</u> 2,15 0,022	1 · ds 4,00	· Tiempo

Tabla 3.6.56. Influencia de la edad del lodo activado en su actividad enzimática.

Experimento: HG-8-6.

[S] = 0	6000 mg Gelatina/l	$SST = 663 \pm 14$	mg/l
pH =	$7,0 \pm 0,1$	$\theta_{c} = 14 d$	
T = :	25,0 ± 0,1 °C		
<u>Tiem</u>	00 (min)	Glicina (10 · M)	
	15	••	
	30		
	45	32,9	
	60 75	52,8 56,7	
	90	71,3	
	105	88,3	
	120	99,1	
	135	110,3	
	150 165		
	180	 	
Determinación de V		datos cinéticos: Glicina = A + V	· Tiempo
Determinación de V max <u>Parámetros</u>		<u>.                                    </u>	' · Tiempo
<u>Parámetros</u>	por regresión lineal de los o	datos cinéticos: Glicina = A + V	' · Tiempo
<u>Parámetros</u> A	por regresión lineal de los o <u>Valor</u>	datos cinéticos: Glicina = A + V $\underline{ds} \qquad \underline{t \cdot ds}$	' · Tiempo
<u>Parámetros</u> A V	por regresión lineal de los o <u>Valor</u> -3,31 0,849	datos cinéticos: Glicina = A + V $ \frac{ds}{3,95} \qquad \frac{t \cdot ds}{7,68} $ $0,042 \qquad 0,081$	' · Tiempo
<u>Parámetros</u> A V <sup>max</sup>	yalor -3,31 0,849  N =	datos cinéticos: Glicina = A + V $ \frac{ds}{3,95} \qquad \frac{t \cdot ds}{7,68} $ $0,042 \qquad 0,081$	' · Tiempo
Parámetros  A V max  R = 0.	yalor -3,31 0,849  N = 309	datos cinéticos: Glicina = A + V $ \frac{ds}{3,95} \qquad \frac{t \cdot ds}{7,68} $ $0,042 \qquad 0,081$	· Tiempo

Tabla 3.6.57. Influencia de la edad del lodo activado en su actividad enzimática. Experimento: HG-9-1.

**	6000 mg Gela			$ST = 659 \pm $	Ü
pH =	$7,0 \pm 0,1$		•	) = 10 d	
T =	25,0 ± 0,1	°C			
Tie	empo (min)		C	s Glicina (10 · M	)
<del></del>	15		_		-
	30			12,5	
	45			18,1	
	60			29,1	
	75 90			34,7 44,1	
	105			53,9	
	120			59,3	
	135			67,0	
	150			70,0	
	165 180			79,9 <b>86</b> ,5	
Determinación de V	7 par regresió	in lineal de l	os datos cináticos	Clicina – A	- V · Tiampo
	7 por regresió max				- V · Tiempo
Determinación de V <u>Parámetros</u>	7 por regresió max	on lineal de l <u>Valor</u>	os datos cinéticos:	Glicina = A $+$	- V · Tiempo
	por regresió				- V · Tiempo
<u>Parámetros</u>	7 por regresió max	<u>Valor</u>	<u>ds</u>	<u>t · ds</u>	- V · Tiempo max
Parámetros A V max	por regresió max  0,997	<i><u>Valor</u></i> -1,70	<u>ds</u> 1,46 0,013	<u>1 · ds</u> 2,65	- V · Tiempo max
Parámetros A V max	0,997	<u>Valor</u> -1,70 0,497	<u>ds</u> 1,46 0,013	<u>1 · ds</u> 2,65	- V · Tiempo
Parámetros  A  V  max  R =  DS =	0,997	<u>Valor</u> -1,70 0,497	<u>ds</u> 1,46 0,013	<u>1 · ds</u> 2,65	- V · Tiempo

Tabla 3.6.58. Influencia de la edal del lodo en su actividad enzimática. Experimento: HG-9-2.

	Gelatina/l		C = 659 ± 16 n	ng/I
$pH = 7,0 \pm 0$	,1	θ	= 10 d	
T = 25,0 ± 0	,1 °C			
<u>Tiempo (min</u> )	<u>).</u>	GI	s icina (10 · M)	
15				
30			15,4	
45 60			22,2	
75				
90			48,6	
105 120			54,9 59,8	
135			71,2	
150 165			75,4 82,8	
180			90,9	
			<del></del>	
Determinación de V por regu	resión lineal de los o	datos cinéticos:	Glicina = A + V	· Tiempo
Determinación de V por regu max <u>Parámetros</u>	resión lineal de los o Valor	datos cinéticos:	Glicina = $\mathbf{A} + \mathbf{V}_{\mathbf{m}}$	· Tiempo ax
<u>Parámetros</u>				· Tiempo
<u>Parámetros</u> A	<u>Valor</u>	<u>ds</u>	<u>1 · ds</u>	· Tiempo ax
<u>Parámetros</u> A V	<u>Valor</u> 0,97	1,42 0,012	<u>1 · ds</u> 2,64	· Tiempo
Parámetros A V max	<u>Valor</u> 0,97 0,502	1,42 0,012	<u>1 · ds</u> 2,64	· Tiempo
A $V_{\text{max}}$ $R = 0,998$	<u>Valor</u> 0,97 0,502	1,42 0,012	<u>1 · ds</u> 2,64	· Tiempo

Tabla 3.6.59. Influencia de la edad del lodo activado en su actividad enzimática.

Experimento: HG-9-3.

	[S] = 6000  mg	Gelatina/l	SST	$=$ 659 $\pm$ 16 mg/l
	$pH = 7,0 \pm 0,$	,1	$\theta_{\rm c}$	= 10 d
	$T = 25,0 \pm 0,$	,1 °C	·	
	Tiempo (min)		Cli	sina (10·M)
		<u> </u>	<u> </u>	<del></del>
	15 30			 15,4
	45			21,3
	60			29,4
	75 90			38,8 45,1
	105			52,4
	120			57,9
	135		•	66,3
	150 165			72,8 77,9
	180			<del></del>
Determina		esión lineal de l	os datos cinéticos:	Glicina = A + V Tiem
Determina <u>Paráme</u>	ación de V por regr	resión lineal de le Valor	os datos cinéticos:	Glicina = A + V · Tiem
	ación de V por regr			Glicina = A + V · Tiem
<u>Paráme</u>	ación de V por regr	Valor	ds	Glicina = A + V Tiem
<i>Paráme.</i> A V	ación de V por regr	<i>Valor</i> 1,56	<i>ds</i>	Glicina = $A + V_{max}$ Tiem $\underbrace{t : ds}_{1,77}$
<i>Paráme.</i> A V	ación de V por regr max	<i>Valor</i> 1,56 0,474	0,96 0,009	Glicina = $A + V_{max}$ Tiem $\underbrace{t : ds}_{1,77}$
<i>Paráme.</i> A V	ación de V por regr uros R = 0,999	<i>Valor</i> 1,56 0,474	0,96 0,009	Glicina = $A + V_{max}$ Tiem $\underbrace{t : ds}_{1,77}$
<u>Paráme</u> A V	ación de V por regretaros $R = 0.999$ $DS = 1.233$	<i>Valor</i> 1,56 0,474	0,96 0,009	Glicina = $A + V_{max}$ Tiem $\underbrace{t : ds}_{1,77}$

Tabla 3.6.60. Influencia de la edad del lodo activado en su actividad enzimática.

Experimento: HG-9-4.

[S] =	6000 mg Ge	latina/l	S	$ST = 610 \pm 13 \text{ mg/l}$	
pH =	$7,0 \pm 0,1$			) = 14 d	
<b>T</b> =	25,0 ± 0,1	°C		•	
T	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	-		5	
1.1	iempo (min)			Glicina (10 · M)	
	15 30				
	45			24,0 34,2	
	60			42,9	
	75			54,9	
	90				
	105			76,1	
	120 135			88,9 95,9	
	150			106,8	
	165			125,4	
	180			132,4	
	· .				
	V por regresi max			: Glicina = $A + V \cdot Tie_{max}$	empo
<u>Parámetros</u>	V por regresi max	<u>Valor</u>	<u>ds</u>	<u>ı·ds</u>	empo
	V por regresi max		<u>ds</u> 1,82	<u>≀·ds</u> 3,34	empo
<u>Parámetros</u>	V por regresi max	<u>Valor</u>	<u>ds</u>	<u>ı·ds</u>	empo
<u>Parámetros</u> A V <sub>max</sub>	V por regresi max 0,998	<u>Valor</u> 0,48	<u>ds</u> 1,82 0,016	<u>≀·ds</u> 3,34	empo
<u>Parámetros</u> A  V  max  R =		<u>Valor</u> 0,48 0,729	<u>ds</u> 1,82 0,016	<u>≀·ds</u> 3,34	empo
$\frac{Parámetros}{A}$ $V_{max}$ $R = DS =$	0,998	<u>Valor</u> 0,48 0,729	<u>ds</u> 1,82 0,016	<u>≀·ds</u> 3,34	empo
$\frac{Parámetros}{A}$ $V_{max}$ $R = DS =$	0,998 2,429	<u>Valor</u> 0,48 0,729	<u>ds</u> 1,82 0,016	<u>≀·ds</u> 3,34	empo

Tabla 3.6.61. Influencia de la edad del lodo activado en su actividad enzimática.

Experimento: HG-9-5.

[S] =	6000 mg Gela	itina/l	SS	$T = 610 \pm 13 \text{ m}$	ıg/l
pH =	$7,0\pm0,1$		θ	= 14 d	
Τ =	25,0 ± 0,1	°C			
	empo (min)		<u>_</u> G	içina_ (10 · M)_	
	15			12,4	
	30			22,8	
	45 60			33,9 	
	75			54,8	
	90			62,1	
	1 <b>0</b> 5 120			75,0 85,4	
	135			96,7	
	150			107,4	
	165 180			 128,3	
		*****			
Determinación de V	V por regresió max	n lineal de l	os datos cinéticos:	Glicina = A + V	· Tiempo
Determinación de V Parámetros	V por regresió max	n lineal de l Valor	os datos cinéticos:	Glicina = $A + V_{n_1}$ $\underline{t \cdot ds}$	· Tiempo
<u>Parámetros</u>	V por regresió max				Tiempo
<i>Parámetros</i> A	V por regresió max	Valor	ds	<u>t · ds</u>	. Tiempo
<i>Parámetros</i> A V max	V por regresió max	<i>Valor</i> 1,57	0,70 0,006	1.28	· Tiempo
Parámetros  A  V  max  R =		1,57 0,702	0,70 0,006	1.28	· Tiempo
Parámetros  A  V max  R = DS =	1,000	1,57 0,702	0,70 0,006	1.28	· Tiempo

Tabla 3.6.62. Influencia de la edad del lodo activado en su actividad enzimática.

Experimento: HG-9-6.

	[S] = 6000  mg	Gelatina/l	SS	$T = 610 \pm 13$	mg/l
	$pH = 7,0 \pm 0,$	1	θ	= 14 d	
	$T = 25,0 \pm 0,$	l °C			
	_Tiempo (min)		G	s licina (10 · M)	
	15	•			
	30			21,4	
	45 60			29,8	
	75			52,5	
	90			61,7	
	105			75,6	
	120			82,9	
	135 150			95,3 101,6	
	165			113,7	
	180			126.9	
	100			126,8	
<b>D</b> etermina		esión lineal de le	os datos cinéticos:		V · Tiempo
Determina <u>Parámet</u>	ción de V por regr	esión lineal de le <u>Valor</u>	os datos cinéticos: <u>ds</u>		V · Tiempo max
<u>Parámet</u>	ción de V por regr			Glicina = A + Y	V · Tiempo max
<u>Parámet</u> A	ción de V por regr	<u>Valor</u>	<u>ds</u>	Glicina = A + $\frac{1 \cdot ds}{}$	V · Tiempo max
<i><u>Parámet</u></i> A V	ción de V por regr	<u>Valor</u> -0,14	<u>ds</u> 1,36	Glicina = A + N $\frac{i \cdot ds}{2,5}$	V · Tiempo max
<i><u>Parámet</u></i> A V	ción de V por regr max	<u>Valor</u> -0,14 0,697	1,36 0,011	Glicina = A + N $\frac{i \cdot ds}{2,5}$	V · Tiempo
<u>Parámet</u> A V	ción de V por regr $ros$	<u>Valor</u> -0,14 0,697	1,36 0,011	Glicina = A + N $\frac{i \cdot ds}{2,5}$	V · Tiempo

## III.6.4. Efectos de los iones metálicos Cu(II) y Zn(II).

La cuarta etapa de la experimentación corresponde al estudio del efecto de los iones de los metales pesados cobre y cinc, de forma individual y en mezclas, sobre la actividad enzimática de los lodos activados.

Los ensayos se han llevado a cabo a 25°C de temperatura, a distintos valores de pH, y con lodos de 10 y 14 días de edad. Tanto las concentraciones de Cu(II) como de Zn(II) ensayadas han sido de 1, 5, 10, 20, y 40 mg/l; y, las mezclas de 1-40, 5-20, 10-10, 20-5 y 40-1 mg/l de Cu(II) y Zn(II), respectivamente.

Las tablas 3.6.63 a 3.6.68 recogen los resultados obtenidos en un experimento de control, en ausencia de metal, y en 5 experimentos realizados en presencia de diferentes concentraciones de Cu(II) a pH 6. De forma análoga, las tablas 3.6.69 a 3.6.74 recogen los obtenidos a pH 7; y, las tablas 3.6.75 a 3.6.80 los llevados a cabo a pH 8.

Los resultados obtenidos, también con lodo de 10 días de edad y en presencia de cinc se muestran en las tablas 3.6.81 a 3.6.86 para pH 6, en las tablas 3.6.87 a 3.6.92 para pH 7 y en las tablas 3.6.93 a 3.6.98 para pH 8.

Por su parte, los resultados de los experimentos con lodo de 10 días de edad en presencia de mezclas de cobre y cinc a pH 6 se muestran en las tablas 3.6.99 a 3.6.104, a pH 7 en las tablas 3.6.105 a 3.6.110 y a pH 8 en las tablas 3.6.111 a 3.6.116.

Por último, se realizaron dos series de ensayos para comparar la inhibición originada por el cobre y el cinc sobre la actividad enzimática de los lodos activados de 10 y 14 días de edad, a pH 7 y temperatura de 25°C. En las tablas 3.6.117 a 3.6.122 se presentan los resultados experimentales de la primera de estas series, que consta de dos grupos de 3 experimentos realizados cada uno de ellos con un tipo de lodo; el primero de los experimentos de cada grupo corresponde a un experimento de control, en ausencia de metal, el segundo en presencia de 20 mg/l de Cu(II) y el tercero en presencia de 20 mg/l

de Zn(II); la segunda serie de ensayos, cuyos resultados se muestran en las tablas 3.6.123 a 3.6.128, son una réplica de la primera y se realizó con objeto de confirmar los resultados experimentales obtenidos en aquélla.

Tabla 3.6.63. Actividad enzimática del lodo activado en presencia de Cu(II) (pH=6). Experimento: HG-10-1.

	000 mg Gelatina/l	SST =	963 ± 22 mg/l
pH =	6,0 ± 0,1	$\theta_{c} =$	10 d
T = 2	25,0 ± 0,1 °C	[Cu] =	0 mg/l
Tiemp	o (min)	Glicina	(10 · M)
	15		**
	30 45		19,5 25,5
	60		43,2
	75		41,4
	90 105		60,7 62,0
	120		78,0
	135		82,6
	150 165		
	180		
			$cina = A + V \cdot Tiempo$ $t \cdot ds$
<u>Parámetros</u>	por regresión lineal de lo <u>Valor</u> 0,55	os datos cinéticos: Gli <u>ds</u> 4,02	cina = A + $V_{\text{max}}$ Tiempo $\frac{t \cdot ds}{7,62}$
	<u>Valor</u>	<u>ds</u>	<u>t · ds</u>
<u>Parámetros</u> A V	<u>Valor</u> 0,55 0,619	<u>ds</u> 4,02 0,045	<u>t · ds</u> 7,62
<u>Parámetros</u> A V <sub>max</sub>	Valor 0,55 0,619 985 N =	<u>ds</u> 4,02 0,045	<u>t · ds</u> 7,62
$\frac{Parámetros}{A}$ $V_{max}$ $R = 0.99$	985 N =	<u>ds</u> 4,02 0,045	<u>t · ds</u> 7,62

Tabla 3.6.64. Actividad enzimática del lodo activado en presencia de Cu(II) (pH=6). Experimento: HG-10-2.

[S] = 6000  mg C	Gelatina/l	SS	$\Gamma = 963 \pm 22 \text{ mg/}$	ł
$pH = 6.0 \pm 0.1$			= 10 d	
T = 25,0 ± 0,1	°C		] = 1 mg/l	
Tiempo (min)		Gli	cina (10 · M)	
15			11,9	
30			17,9	
45 60			30,3 43,3	
75			52,4	
90			59,8	
105 120			67,7 	
120			<del></del> 	
150			99,0	
165 180			1 <b>09,0</b> 11 <b>7,</b> 0	
				· .
Determinación de V por regre	esión lineal de los	datos cinéticos:	Glicina = A + V · max	Tiempo
Determinación de V por regro max	esión lineal de los <u>Valor</u>	datos cinéticos:	Glicina = $A + V_{max}$ $\underbrace{t \cdot ds}$	Tiempo
<u>Parámetros</u>				Tiempo
<u>Parámetros</u> A	<u>Valor</u>	<u>ds</u>	<u>ı·ds</u>	Tiempo
<u>Parámetros</u> A V	<u>Valor</u> 1,67	<u>ds</u> 1,17 0,011	<u>ı·ds</u> 2,14	Tiempo
<u>Parámetros</u> A V <sub>max</sub>	<u>Valor</u> 1,67 0,647	<u>ds</u> 1,17 0,011	<u>ı·ds</u> 2,14	Tiempo
A $V_{max}$ $R = 0,999$	<u>Valor</u> 1,67 0,647	<u>ds</u> 1,17 0,011	<u>ı·ds</u> 2,14	Tiempo

Tabla 3.6.65. Actividad enzimática del lodo activado en presencia de Cu(II) (pH=6). Experimento: HG-10-3.

[S] = 600	00 mg Gelatina/l	SST =	$963 \pm 22 \text{ mg/l}$
pH = 6	0,0 ± 0,1	$\theta_{c} =$	10 d
T = 25	,0 ± 0,1 °C	[Cu] =	5 mg/l
<u>Tiempo</u>	(min)	<u>Glicina</u>	(10 · M)
	15		••
	30 45		16,6
	45 60		23,4 31,3
7	75		37,6
	90 05		45,7 57,8
	20		63,9
	35		74,4
	50 65		 
	80		99,9
Determinación de V pax	por regresión lineal de los	datos cinéticos: Gli	cina = A + V · Tiempo
Determinación de V parámetros	por regresión lineal de los <u>Valor</u>	datos cinéticos: Gli	cina = A + $V_{\text{max}}$ Tiempo
Parámetros			
<u>Parámetros</u> A	<u>Valor</u>	<u>ds</u> 1,32	<u>ı · ds</u>
<u>Parámetros</u> A V	-2,43 0,563	1,32 0,013	<u>ı·ds</u> 2,46
Parámetros A V max	$\frac{Valor}{-2,43}$ 0,563  N = 9	1,32 0,013	<u>ı·ds</u> 2,46
Parámetros  A  V  max  R = 0,99	$\frac{Valor}{-2,43}$ 0,563 $N = 9$	1,32 0,013	<u>ı·ds</u> 2,46

Tabla 3.6.66. Actividad enzimática del lodo activado en presencia de Cu(II) (pH=6). Experimento: HG-10-4.

[S] = 60	000 mg Gelatina/l	SST =	$963 \pm 22 \text{ mg/l}$
pH =	6,0 ± 0,1	$\theta_{c} =$	10 d
T = 2:	5,0 ± 0,1 °C	[Cu] =	10 mg/l
Tiempe	o (min)	Glicina	(10 · M)
<u> remp</u>	15	- Oncine	11,2
	30		18,1
	45		24,9
	60		33,7
	75 90		43,1 48,8
	105		61,1
	120		65,2
	135 150		73,8 81,5
	165		
1	180		
Determinación de V max			$icina = A + V \cdot Tiempo$ $max$
Determinación de V max <u>Parámetros</u>	<u>Valor</u>	<u>ds</u>	<u>t · ds</u>
Determinación de V max <u>Parámetros</u> A	<u>Valor</u> 2,41	<u>ds</u> 0,95	<u>ı·ds</u> 1,75
Determinación de V max <u>Parámetros</u>	<u>Valor</u>	<u>ds</u>	<u>t · ds</u>
Determinación de V max <u>Parámetros</u> A	2,41 0,530	0,95 0,010	<u>ı·ds</u> 1,75
Determinación de V max <u>Parámetros</u> A V max	2,41 0,530 N =	0,95 0,010	<u>ı·ds</u> 1,75
Determinación de V max  Parámetros  A  V max  R = 0.9 DS = 1.3	2,41 0,530 N =	0,95 0,010	<u>ı·ds</u> 1,75
Determinación de V max  Parámetros  A  V max  R = 0,9	2,41 0,530 N =	0,95 0,010	<u>ı·ds</u> 1,75

Tabla 3.6.67. Actividad enzimática del lodo activado en presencia de Cu(II) (pH=6). Experimento: HG-10-5.

	[S] = 6000  mg	g Gelatina/I		$=$ 963 $\pm$ 22 mg/	′1
	$pH = 6.0 \pm 0$	),1	$\theta_{c}$	= 10 d	
	$T = 25,0 \pm 0$	),1 °C	[Cu]	= 20 mg/l	_
	Tiempo (mir	-)	Glic	ina (10 · M)	
	-	<u></u>	Gilc		
	15 30			 11,0	
	45			22,4	
	60			21,3	
	75 90			35,2 37,7	
	105			46,2	
	120			55,5	
	135			62,9	
	150 165			66,1 75,7	
	180			79,5	
					<u> </u>
	ción de V por reg			Glicina = A + V · max	Tiempo
Determina <u>Parámet</u>	ción de V por reg	gresión lineal de <u>Valor</u>	los datos cinéticos:	Glicina = $A + V_{max}$	Tiempo
	ción de V por reg				Tiempo
<u>Parámet</u>	ción de V por reg	<u>Valor</u>	<u>ds</u>	<u>t · ds</u>	Tiempo
<i>Parámet</i> A V	ción de V por reg	<u>Valor</u> -1,89	1,89 0,016	1 · ds 3,43	Tiempo
<i>Parámet</i> A V	ción de V por reg	-1,89 0,463	1,89 0,016	1 · ds 3,43	Tiempo
<u>Parámet</u> A V	ros  R = 0,994	-1,89 0,463	1,89 0,016	1 · ds 3,43	Tiempo

Tabla 3.6.68. Actividad enzimática del lodo activado en presencia de Cu(II) (pH=6). Experimento: HG-10-6.

[S] = 60	000 mg Gelatina/l	$SST = 963 \pm 22 \text{ mg/l}$	
pH =	6,0 ± 0,1	$\theta_{c} = 10 \text{ d}$	
T = 2	5,0 ± 0,1 °C	[Cu] = 40 mg/l	
_Tiemp	o (min)	Glicina (10 · M)	
	15	8,6	
	30	9,8	
	45 60	31,2	
	75 90	38,4	
1	105	49,0	
	120	52,0	
	135 150	57,0 65,9	
	165 180	79,6 82,9	
·			
eterminación de V max	por regresión lineal d	e los datos cinéticos: Glicina = A + V · Tie	empo
eterminación de V max <u>Parámetros</u>	por regresión lineal d <u>Valor</u>		ешро
<u>Parámetros</u>		<u>ds t∴ds</u>	empo
max <u>Parámetros</u>	<u>Valor</u>	<u>ds</u> <u>1∴ds</u> 2,39 4,38	етро
max <u>Parámetros</u>	<u>Valor</u> -0,56 0,457		етро
max <u>Parámetros</u> T	-0,56 0,457 N =		етро
$\frac{Parámetros}{A}$ $V$ $max$ $R = 0.9$	Valor -0,56 0,457 992 N =		етро

Tabla 3.6.69. Actividad enzimática del lodo activado en presencia de Cu(II) (pH=7). Experimento: HG-11-1.

	[S] = 6000  mg	Gelatina/l	SST =	939 ± 20 mg/l	
	$pH = 7,0 \pm 0,$	1	$\theta_{c} =$	10 d	
	$T = 25,0 \pm 0,$	1 °C	[Cu] =	0 mg/l	
	Tiempo (min)	<del></del> -	Glicina	(10 · M)	
	15			12,2	
	30			23,9	
	45			36,3	
	60			48,8	
	75 90			59,2 73,5	
	105			83,5	
	120			92,4	
	135			<del></del>	
	150 165			114,4 129,2	
	180			139,9	
Determina	ación de V por regr	resión lineal de los	s datos cinéticos: Gli	cina = A + V · Tie	empo
Determina <u>Paráme</u>	max	resión lineal de los <u>Valor</u>	s datos cinéticos: Gli	cina = $A + V \cdot Tie$ $\frac{t \cdot ds}{}$	empo
<u>Paráme</u>	max		ds	max	empo
<u>Paráme</u> A	max	<u>Valo</u> r	<i>ds</i> 0,93	max <u>t · ds</u>	empo
<u>Paráme</u> A V	max	<u>Valor</u> 1,75	0,93 0,009	max <u>t · ds</u> 1,68	empo
<u>Paráme</u> A V	max Piros	<u>Valor</u> 1,75 0,767	0,93 0,009	max <u>t · ds</u> 1,68	empo
<u>Paráme</u> A V	R = 0,999	<u>Valor</u> 1,75 0,767	0,93 0,009	max <u>t · ds</u> 1,68	empo

Tabla 3.6.70. Actividad enzimática del lodo activado en presencia de Cu(II) (pH=7). Experimento: HG-11-2.

	mg Gelatina/l	SST =	_
pH = 7,0	0 ± 0,1	$\theta_{c} =$	10 d
T = 25,0	0 ± 0,1 °C	[Cu] =	1 mg/l
Tiempo	(min)	Glicina	(10 · M)
15	5		11,5
30	)		26,8
45 60			38,9 44,0
75			57,1
90			69,4
105 120			87,2
135	;		99,9
150 165			118,0
180			
	<del></del>		
Determinación de V po	or regresión lineal de	los datos cinéticos: Gli	cina = A + V · Tiempo
Determinación de V po max <u>Parámetros</u>	or regresión lineal de <u>Valor</u>	los datos cinéticos: Gli	$cina = A + V \cdot Tiempo$ $\underline{t \cdot ds}$
Parámetros			max
max <u>Parámetros</u> A	<u>Valor</u>	<u>ds</u>	max <u>t∵ds</u>
max <u>Parámetros</u> A	2,21 0,740	<u>ds</u> 2,17 0,024	<u>t · ds</u> 4,03
Max <u>Parámetros</u> A  V  max	2,21 0,740 N =	<u>ds</u> 2,17 0,024	<u>t · ds</u> 4,03
$\frac{Par\acute{a}metros}{Par\acute{a}metros}$ A V max $R = 0,996$	2,21 0,740 N =	<u>ds</u> 2,17 0,024	<u>t · ds</u> 4,03

Tabla 3.6.71. Actividad enzimática del lodo activado en presencia de Cu(II) (pH=7). Experimento: HG-11-3.

[S] = 6000  mg	g Gelatina/l		$\Gamma = 939 \pm 20$	mg/i
$pH = 7.0 \pm 0$	),1	θ	= 10 d	
$T = 25.0 \pm 0$	0,1 °C	[Cu	] = 5 mg/l	
Tiempo (ınir	n)	Gli	5 Sina (10 · M)	
15			11,6	
30			25,1	
45 60			34,9 43,6	
75			58,3	
90			66,7	
105 120			72,5 89,1	
135			•-	
150				
165 180				
				<u> </u>
Determinación de V por reg	gresión lineal de los	datos cinéticos:	Glicina = A + V	· Tiempo
Determinación de V por reg max	gresión lineal de los <u>Valor</u>	datos cinéticos:	Glicina = A + V	· Tiempo
<u>Parámetros</u>				· Tiempo
<u>Parámetros</u>	<u>Valor</u>	ds	<u>1 · ds</u>	· Tiempo nax
<u>Parámetros</u> A V	<u>Valor</u> 2,57	<u>ds</u> 1,89 0,025	<u>ı·ds</u> 3,58	· Tiempo
Parámetros A V max	<u>Valor</u> 2,57 0,706	<u>ds</u> 1,89 0,025	<u>ı·ds</u> 3,58	· Tiempo
A $V_{max}$ $R = 0,996$	<u>Valor</u> 2,57 0,706	<u>ds</u> 1,89 0,025	<u>ı·ds</u> 3,58	· Tiempo

Tabla 3.6.72. Actividad enzimática del lodo activado en presencia de Cu(II) (pH=7). Experimento: HG-11-4.

[S] = 6000  mg	g Gelatina/l	SST	$=$ 939 $\pm$ 20 m	ng/l
$pH = 7.0 \pm 0$	),1	θ	= 10 d	
T = 25,0 ± 0	),1 °C		] = 10 mg/l	
<u>Tiempo (mi</u>	<u>n)</u>	Gli	ina (10 · M)	
15			8,7	
30 45			20,7 31,0	
60			31,0	
75 90			58,3	
105			67,2	
120 135			79 <u>,2</u>	
150			93,9	
165 180			101,0 111,0	
Determinación de V por reg	gresión lineal de los	datos cinéticos:	Glicina = A + V	· Tiempo
Determinación de V por reg <u>Parámetros</u>	gresión lineal de los <u>Valor</u>	datos cinéticos:		· Tiempo
<u>Parámetros</u>				- Tiempo
<u>Parámetros</u> A	<u>Valor</u>	<u>ds</u>	1 · ds	· Tiempo
<u>Parámetros</u> A V	<u>Valor</u> 2,39	<u>ds</u> 1,39 0,012	<u>1 · ds</u> 2,59	· Tiempo
<u>Parámetros</u> A V max	<u>Valor</u> 2,39 0,611	<u>ds</u> 1,39 0,012	<u>1 · ds</u> 2,59	· Tiempo
A $V_{max}$ $R = 0,999$	<u>Valor</u> 2,39 0,611	<u>ds</u> 1,39 0,012	<u>1 · ds</u> 2,59	· Tiempo

Tabla 3.6.73. Actividad enzimática del lodo activado en presencia de Cu(II) (pH=7). Experimento: HG-11-5.

	Gelatina/l	SS	$\Gamma = 939 \pm 20 \text{ m}$	g/l
$pH = 7,0 \pm 0,1$	1		= 10 d	
$T = 25,0 \pm 0,$	l °C	[Cı	a] = 20 mg/l	
<u> Tiempo (min)</u>	-	<u>_G</u> 1	cina (10 · M)	
15			5,8	
30			13,5	
45 60			21,1 32,3	
75 20			41,2	
90 105			44,2 57,1	
120			59,4	
135 150			<b>70</b> ,1	
165			**	
180			91,3	
		<del></del>		. <u></u>
max			Glicina = A + V	· Tiempo
Determinación de V por regr max	esión lineal de los <u>Valor</u>	datos cinéticos:	Glicina = A + V $t \cdot ds$	· Tiempo
max <u>Parámetros</u>			D <sub>1</sub> a)	· Tiempo
max <u>Parámetros</u> A	<u>Valor</u>	<u>ds</u>	<u>t∙ds</u>	· Tiempo
max <u>Parámetros</u> A  V  max	<u>Valor</u> -0,90	<u>ds</u> 1,43 0,015	<u>t·ds</u> 2,62	· Tiempo
Max <u>Parámetros</u> A  V  max  R = 0,997	<u>Valor</u> -0,90 0,520	<u>ds</u> 1,43 0,015	<u>t·ds</u> 2,62	· Tiempo
$\frac{\text{max}}{Par\acute{a}metros}$ A V max $R = 0,997$ $DS = 2,227$	<u>Valor</u> -0,90 0,520	<u>ds</u> 1,43 0,015	<u>t·ds</u> 2,62	· Tiempo
$\frac{Par\acute{a}metros}{R}$ $V$ $max$ $R = 0,997$	<u>Valor</u> -0,90 0,520	<u>ds</u> 1,43 0,015	<u>t·ds</u> 2,62	· Tiempo

Tabla 3.6.74. Actividad enzimática del lodo activado en presencia de Cu(II) (pH=7). Experimento: HG-11-6.

[S] = 6000  mg	Gelatina/l	SS	$\Gamma = 939 \pm 20 \text{ mg/s}$	l
$pH = 7.0 \pm 0.$	,1		= 10 d	
T = 25,0 ± 0	,1 °C		] = 40 mg/l	
Tiempo (min	<u>)                                    </u>	Gli	cina (10 M)	
15	_			
30			21,2	
45 60			30,7 34,9	
75			38,5	
90 105			53,2 63,9	
120				
135 150				
165 180			89,6 95,9	
				<u>.</u>
Determinación de V por reg	resión lineal de los	datos cinéticos:	Glicina = A + V · max	Tiempo
Determinación de V por reg max	resión lineal de los <u>Valor</u>	datos cinéticos:	Glicina = $A + V$ max $\underbrace{t \cdot ds}$	Tiempo
Parámetros				Tiempo
<u>Parámetros</u> A	<u>Valor</u>	<u>ds</u>	<u>t · ds</u>	Tiempo
<u>Parámetros</u> A V	<u>Valor</u> 6,01	<u>ds</u> 2,40 0,022	<u>1 · ds</u> 4,54	Tiempo
<u>Parámetros</u> A V <sub>max</sub>	<u>Valor</u> 6,01 0,506	<u>ds</u> 2,40 0,022	<u>1 · ds</u> 4,54	Tiempo
A $V_{\text{max}}$ $R = 0.994$	<u>Valor</u> 6,01 0,506	<u>ds</u> 2,40 0,022	<u>1 · ds</u> 4,54	Tiempo

Tabla 3.6.75. Actividad enzimática del lodo activado en presencia de Cu(II) (pH=8). Experimento: HG-12-1.

[S] =	6000 mg Gelatina/l		$=$ 694 $\pm$ 15 mg/l
pH =	8,0 ± 0,1	$\Theta_{c}$	= 10 d
T =	25,0 ± 0,1 °C	(Cu)	= 0 mg/l
<u>Tie</u>	mpo (min)	<u>Glici</u>	s na (10 · M)
	15		••
	30		
	45 60		28,7
	75		36,8
	90		48,9
	105 120		57,8 62,3
	135		67,7
	150		75,3
	165		81,4
			88,0
Determinación de V	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	os datos cinéticos: (	88,0
Determinación de V r <u>Parámetros</u>	. por regresión lineal de le le <u>Valor</u>	os datos cinéticos: (	88,0 Glicina = A + V · Tiempo
<u>Parámetros</u>	, por regresión lineal de lo nax		88,0 Glicina = A + V · Tiempo
<u>Parámetros</u> A	, por regresión lineal de lo nax <u>Valor</u>	<u>ds</u>	$\frac{88,0}{\text{Glicina}} = \mathbf{A} + \mathbf{V} \cdot \text{Tiempo}$ $\frac{t \cdot ds}{}$
<u>Parámetros</u> A V	por regresión lineal de lo <u>Valor</u> 2,94 0,482	2,79 0,022	$88,0$ Glicina = A + V Tiempo $\frac{t \cdot ds}{5,2}$
<u>Parámetros</u> A V <sub>max</sub>	por regresión lineal de la valor 2,94 0,482 0,993 N =	2,79 0,022	$88,0$ Glicina = A + V Tiempo $\frac{t \cdot ds}{5,2}$
Parámetros  A  V  max  R =	por regresión lineal de la valor 2,94 0,482 0,993 N = 2,574	2,79 0,022	$88,0$ Glicina = A + V Tiempo $\frac{t \cdot ds}{5,2}$

Tabla 3.6.76. Actividad enzimática del lodo activado en presencia de Cu(II) (pH=8). Experimento: HG-12-2.

Parámetros  A  V  max  R  DS	= 0,993 = 2,033 = 8,2E-06	3,78 0,477 N =	ds 3,54 0,026	<u>1 · ds</u> 6,88 0,050	
Parámetros  A  V  max  R  DS	= 2,033	3,78 0,477	3,54 0,026	6,88	
Parámetros A V max	= 0,993	3,78 0,477	3,54 0,026	6,88	
<u>Parámetros</u> A V		3,78	3,54	6,88	
<u>Parámetros</u> A V		3,78	3,54	6,88	
<u>Parámetros</u>					
		<u>Valor</u>	ds	<u>1 · ds</u>	
Determinación	de V por regre	esión lineal de l	os datos cinéticos:	Glicina = $\Lambda + V \cdot T$	Siempo -
	180			91,2	
	150 165			74,1 81,4	
	120 135			64,3 66,7	
	90 105			47,1 52,3	
	75			 	
	45 60			<del></del>	
	15 30				
	<u>Tiempo (min)</u>		<u>Gl</u> i	cina (10° M)	
				5	
Т	$=$ 25,0 $\pm$ 0,1	°C	[Cı	1 = 1 mg/l	
_	$=$ 8,0 $\pm$ 0,1			= 10 d	
•				$\Gamma = 694 \pm 15 \text{ mg/l}$	

Tabla 3.6.77. Actividad enzimática del lodo activado en presencia de Cu(II) (pH=8).

Experimento: HG-12-3.

[5] — 0000 mg (	Gelatina/l	SST	$=$ 694 $\pm$ 15 mg/l	
$pH = 8,0 \pm 0,1$	I	$\theta_{c}$	= 10 d	
$T = 25,0 \pm 0,1$	1 °C	[Cu]	= 5 mg/l	
Tiempo (min)	<del></del> -	Glici	s ла <u>(10·М)</u>	
15	-			
30				
45 60			•• ••	
75				
90 105			47,3 53,2	
120			63,0	
135 150			68,5 78,5	
165 180			85,0 89,6	
Determinación de V por regr	esión lineal de los	datos cinéticos:	Glicina = A + V · Tie	empo
Determinación de V por regr max	esión lineal de los <u>Valor</u>	datos cinéticos:	Glicina = A + V · Tie max	empo
<u>Parámetros</u>			max	empo
<u>Parámetros</u> A	<u>Valor</u>	<u>ds</u>	max <u>t · ds</u> 5,06	empo
<u>Parámetros</u> A V max	<u>Valor</u> 3,09	<u>ds</u> 2,61 0,019	max <u>t · ds</u> 5,06	empo
<u>Parámetros</u> A V max	<u>Valor</u> 3,09 0,490	<u>ds</u> 2,61 0,019	max <u>t · ds</u> 5,06	empo
$\frac{Par \acute{a}metros}{R}$ $R = 0,996$	<u>Valor</u> 3,09 0,490	<u>ds</u> 2,61 0,019	max <u>t · ds</u> 5,06	empo

Tabla 3.6.78. Actividad enzimática del lodo activado en presencia de Cu(II) (pH=8). Experimento: HG-12-4.

	Gelatina/I	$SST = 694 \pm 15 $	ng/l
$pH = 8.0 \pm 0.1$	l	$\theta_{c} = 10 d$	
$T = 25,0 \pm 0,1$	ı °C	[Cu] = 10 mg/l	
<u>Tiempo</u> (min)		Glicina (10 M)	
15		13,2	
30		24,3	
45 60		23,2 33,8	
75		39,7	
90		49,7	
105 120		49,3 63,2	
135		67,5	
150 165		87,0	
180		87,0	
Determinación de V por regr	esión lineal de los	datos cinéticos: Glicina = A + V	· Tiempo
Determinación de V por regr max	esión lineal de los <u>Valor</u>	datos cinéticos: Glicina = $A + V_{in}$	Tiempo ax
max  Parámetros		n	Tiempo ax
max	<u>Valor</u>	<u>ds t∙ds</u>	Tiempo
max	<u>Valor</u> 5,49	<u>ds</u> <u>t · ds</u> 2,21 4,06  0,023 0,042	· Tiempo
max Parámet <u>ros</u> A V max	<u>Valor</u> 5,49 0,471	<u>ds</u> <u>t · ds</u> 2,21 4,06  0,023 0,042	· Tiempo
Parámetros  A  V max  R = 0,990	<u>Valor</u> 5,49 0,471	<u>ds</u> <u>t · ds</u> 2,21 4,06  0,023 0,042	Tiempo

Tabla 3.6.79. Actividad enzimática del lodo activado en presencia de Cu(II) (pH=8). Experimento: HG-12-5.

	Gelatina/l	SS	$\Gamma = 694 \pm 15 \text{ m}$	g/l
$pH = 8.0 \pm 0.1$	l	θ	= 10 d	
$T = 25,0 \pm 0,1$	°C	[Cu	] = 20 mg/l	
_Tiempo (min)		Gli	5 Eina (10 · M)	
15			<u>.</u> _	
30				
45				
60 75			24,0 30,6	
90			41,1	
105			47,7	
120			53,1	
135 150			58,4 64,4	
165			77,6	
180			79,1	
max			Glicina = A + V	· Tiempo
Determinación de V por regr max	esión lineal de l <u>Valor</u>	os datos cinéticos:	Glicina = $A + V_{max}$ $t \cdot ds$	· Tiempo
Parámetros			ma:	Tiempo
Parámetros  A	<u>Valor</u>	<u>ds</u>		Tiempo
Parámetros  A	<u>Valor</u> -2,94	<u>ds</u> 2,46 0,020	i <u>i ds</u> 4,58	· Tiempo
Max *  Parámetros  A  V  max	<u>Valor</u> -2,94 0,465	<u>ds</u> 2,46 0,020	i <u>i ds</u> 4,58	Tiempo
Parámetros  A  V  max  R = 0,994	<u>Valor</u> -2,94 0,465	<u>ds</u> 2,46 0,020	i <u>i ds</u> 4,58	Tiempo

Tabla 3.6.80. Actividad enzimática del lodo activado en presencia de Cu(II) (pH=8). Experimento: HG-12-6.

	Gelatina/l	SST	$=$ 694 $\pm$ 15	mg/I
$pH = 8,0 \pm 0$	,1	θ	= 10 d	
T = 25,0 ± 0	,1 °C	[Cu	= 40 mg/l	
<u>Tiempo (min</u>	.)_	Glid	s ina (10 M)	
15				
30			10,1	
45			18,7	
. 60 75			 35,7	
90			43,6	
105			49,3	
120 135			52,3 60,4	
150			74,8	
165			78,1	
180			86,4	
eterminación de V por reg	resión lineal de los	datos cinéticos:	Glicina = A + V	· Tiempo
eterminación de V por reg max <u>Parámetros</u>	resión lineal de los <u>Valor</u>	datos cinéticos:	Glicina = $A + V_{t}$	· Tiempo
max Parámetros			ī	· Tiempo
max	<u>Valor</u>	<u>ds</u>	<u>t·ds</u>	· Tiempo
max · · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	<u>Valor</u> -3,67	2,00 0,017	<u>t·ds</u> 3,67	· Tiempo
max Parámetros A V max	<u>Valor</u> -3,67 0,499	2,00 0,017	<u>t·ds</u> 3,67	· Tiempo
$\frac{Parámetros}{A}$ $V_{max}$ $R = 0,996$	<u>Valor</u> -3,67 0,499	2,00 0,017	<u>t·ds</u> 3,67	· Tiempo

Tabla 3.6.81. Actividad enzimática del lodo activado en presencia de Zn(II) (pH=6). Experimento: HG-13-1.

	[S] = 6000  mg			$\Gamma = 935 \pm 20 i$	ng/l
	$pH = 6.0 \pm 0.3$	1	θ	= 10 d	
	$T = 25,0 \pm 0,0$	1 °C	[Zr	] = 0 mg/l	
	<u>Tiempo (min)</u>	_	<u>Gli</u>	s cina (10 · M)	
	15			••	
	30				
	45 60			23,0 29,7	
	75			39,3	
	90 105			48,0 58,0	
	120			65,7	
	135 150			72,3 77,6	
	165			90,7	
	180				
				<del>-</del>	
Determinac	zión de V por regr	esión lineal de los	datos cinéticos:	Glicina = A + V	· Tiempo
Determinac Parámetr		esión lineal de los Valor	datos cinéticos:		· Tiempo
<u>Parámetr</u>					Tiempo oax
<u>Parámetr</u> A		Valor	<u>ds</u>	<u>t · ds</u>	Tiempo oax
<i>Parámetr</i> A V	ros	-2,09	1,68 0,015	<u>t·ds</u> 3,12	· Tiempo
<i>Parámetr</i> A V	ros	-2,09 0,554	1,68 0,015	<u>t·ds</u> 3,12	· Tiempo
<u>Parámetr</u> A V	R = 0.997	-2,09 0,554	1,68 0,015	<u>t·ds</u> 3,12	· Tiempo

Tabla 3.6.82. Actividad enzimática del lodo activado en presencia de Zn(II) (pH=6). Experimento: HG-13-2.

	g Gelatina/l		$\Gamma = 935 \pm 20$	mg/1
$pH = 6.0 \pm 0$			= 10 d	
$T = 25.0 \pm 0$	0,1 °C	[Zr	i) = 1 mg/i	
_Tiempo(mi	n)	Gli	cina (10 · M)	
15				
30			12,8	
45			24,3	
60 75			29,6 42,0	
90			50,6	
105			56,7	
120			64,1	
135 150			77,6 83,4	
165			91,1	
180			93,8	
Determinación de V por re			Glicina = A + V	· Tiempo
Determinación de V por re	gresión lineal de <u>Valor</u>	los datos cinéticos:	Glicina = A + V	· Tiempo
Determinación de V por res max			Glicina = A + V	· Tiempo nax
Determinación de V por res max <u>Parámetros</u>	<u>Valor</u>	<u>ds</u>	Glicina = A + V $\underline{t \cdot ds}$	· Tiempo nax
Determinación de V por reg max <u>Parámetros</u>	<u>Valor</u> -1,53	<u>ds</u> 1,93 0,017	Glicina = A + V $\frac{t \cdot ds}{3,49}$	· Tiempo
Determinación de V por res <u>Parámetros</u> A	-1,53 0,557	<u>ds</u> 1,93 0,017	Glicina = A + V $\frac{t \cdot ds}{3,49}$	· Tiempo
Peterminación de V por reg Parámetros  A  V max  R = 0,996	-1,53 0,557	<u>ds</u> 1,93 0,017	Glicina = A + V $\frac{t \cdot ds}{3,49}$	· Tiempo

Tabla 3.6.83. Actividad enzimática del lodo activado en presencia de Zn(II) (pH=6). Experimento: HG-13-3.

[S] =	6000 mg Gelatir	na/l		$T = 935 \pm 20$	mg/l
pH =	$6.0 \pm 0.1$		е	c = 10 d	
T =	25,0 ± 0,1 °C		[Z	n] = 5 mg/l	·
<u>Ti</u>	empo (min)		<u>_G</u> 1	icina (10 · M)	
	15				•
	30 45			10,0 20,0	
	60			31,6	
	75			35,1	
	90 105			44,5 52,7	
	120			65,3	
	135 150			74,5 72,8	
	165			81,8	
	180			92,7	
10 ·		. <u> </u>	<del></del>	- <u> </u>	······
Determinación de V	V por regresión	lineal de I	os datos cinéticos:	Glicina = A + V	· Tiempo
Determinación de V	V por regresión max	lineal de I	os datos cinéticos: ds	Glicina = A + $V_{n}$	· Tiempo
<u>Parámetros</u>	V por regresión				· Tiempo
<u>Parámetros</u> A	V por regresión	<u>Valor</u>	<u>ds</u>	<u>t·ds</u>	· Tiempo
Parámetros A V max		<u>Valor</u> -3,43	<u>ds</u> 2,40	<u>ı·ds</u> 4,35	· Tiempo
Parámetros  A  V  max  R =		-3,43 0,536	2,40 0,021	<u>ı·ds</u> 4,35	· Tiempo
Parámetros  A  V max  R = DS =	0,993	-3,43 0,536	2,40 0,021	<u>ı·ds</u> 4,35	· Tiempo

Tabla 3.6.84. Actividad enzimática del lodo activado en presencia de Zn(II) (pH=6). Experimento: HG-13-4.

[S] = 6000  mg	Gelatina/l	SS	$\Gamma = 935 \pm 20$	mg/i
$pH = 6.0 \pm 0,$	1		= 10 d	
$T = 25.0 \pm 0,$	1 °C		] = 10 mg/l	
Tiempo (min)	<u> </u>	<u>Gli</u>	cina (10 · M)	
15			*-	
30				
45 60			24,5 33,2	
75			35,3	
90			49,0	
105 120			49,8 57,2	
135			69,6	
150				
165 180			84,8	
	esión lineal de los	datos cinéticos:		· Tiempo
	esión lineal de los <u>Valor</u>	datos cinéticos:		· Tiempo
Determinación de V por regr max <u>Parámetros</u>			Glicina = A + V	· Tiempo
Determinación de V por regr max Parámetros	Valor	<u>ds</u>	Glicina = A + V u t∴ds	· Tiempo
Determinación de V por regr max Parámetros A	<u>Valor</u> 1,32	3,04 0,029	Glicina = $A + V_{uv}$ $t \cdot ds$ 5,76	· Tiempo
Determinación de V por regr <u>Parámetros</u> A V	1,32 0,494	3,04 0,029	Glicina = $A + V_{uv}$ $t \cdot ds$ 5,76	· Tiempo
Determinación de V por regr <u>Parámetros</u> A V max R = 0,990	1,32 0,494	3,04 0,029	Glicina = $A + V_{uv}$ $t \cdot ds$ 5,76	· Tiempo

Tabla 3.6.85. Actividad enzimática del lodo activado en presencia de Zn(II) (pH=6). Experimento: HG-13-5.

[0]	= 6000 mg 0	Gelatina/l	SS	$\Gamma = 935 \pm 20 \text{ mg}$	g/l
pН	$=$ 6,0 $\pm$ 0,1		θ	= 10 đ	
Т	$=$ 25,0 $\pm$ 0,1	°C		] = 20 mg/l	
	Tiempo (min)		<u>Gii</u>	cina (10 · M)	
	15			<u></u>	
	30				
	45 60				
	75			40,7	
	90			50,7	
	105			52,8 62,9	
	120 135			63,9	
	150			72,2	
	165 180			84,9 89.7	
eterminación (	de V por regre	esión lineal de lo	os datos cinéticos:	Glicina = A + V	· Tiempo
eterminación (	de V por regre	esión lineal de lo <u>Valor</u>	os datos cinéticos:	Glicina = $A + V_{max}$	· Tiempo
<u>Parámetros</u>	de V por regre				· Tiempo
<u>Parámetros</u> A	de V por regra	<u>Valor</u>	<u>ds</u>	<u>1 · ds</u>	· Tiempo
<u>Parámetros</u> A M Max	de V por regremax = 0,988	<u>Valor</u> 6,42	<u>ds</u> 3,86 0,029		· Tiempo
<u>Parámetros</u> A V max R		<u>Valor</u> 6,42 0,457	<u>ds</u> 3,86 0,029		· Tiempo
Parámetros  A  V  max  R  DS	= 0,988	<u>Valor</u> 6,42 0,457	<u>ds</u> 3,86 0,029		· Tiempo

Tabla 3.6.86. Actividad enzimática del lodo activado en presencia de Zn(II) (pH=6). Experimento: HG-13-6.

	= 6000 mg 0	Gelatina/l	SS	$T = 935 \pm 20$	mg/l
pH =	$=$ 6,0 $\pm$ 0,1		6	c = 10 d	
T =	= 25,0 ± 0,1	°C	[2	n] = 40 mg/l	
	Tiempo (min)		G	icina (10 M)	
_	15			9,3	
	30			16,4	
	45 60			19,4 28,2	
	75				
	90 105			42,2	
	120			57,6	
	135			63,6	
	150 165			60,9 73,8	
	180			70,8	
	e V por regro				· Tiempo
Determinación de	e V por regre	esión lineal de <u>V</u> alor	los datos cinéticos:	Glicina = A + $\frac{1 \cdot ds}{}$	· Tiempo
<u>Parámetros</u>	e V por regre			r	· Tiempo nax
<u>Parámetros</u> A	e V por regre	<u>Valor</u>	<u>ds</u>	<u>t · ds</u>	· Tiempo
<u>Parámetros</u> A V	max	<u>Valor</u> 3,60	2,67 0,023	<u>i·ds</u> 4,88	· Tiempo nax
<u>Parámetros</u> A V <sub>max</sub>	max = 0,987	3,60 0,404	2,67 0,023	<u>i·ds</u> 4,88	· Tiempo
A V max R = DS =	max = 0,987	3,60 0,404	2,67 0,023	<u>i·ds</u> 4,88	· Tiempo

Tabla 3.6.87. Actividad enzimática del lodo activado en presencia de Zn(II) (pH=7). Experimento: HG-14-1.

	ng Gelatina/l		955 ± 20 mg/l
$pH = 7.0 \pm$	0,1	$\theta_{c} =$	10 d
T = 25,0 ±	0,1 °C	[Zn] =	0 mg/l
<u>Tiempo (m</u>	nin)	Glicina	(10 · M)
15			
30			21,7
45			33,6
60 75			43,4 54,1
90			64,0
105			 
120			87,2
135 150			100,0 110,9
165			117,1
180		a	••
180	regresión lineal de los	datos cinéticos: Glic	
180	egresión lineal de los Valor	datos cinéticos: Glic	cina = A + V · Tiempo
180 Determinación de V por r max			cina = A + V · Tiempo
180 Determinación de V por r <u>Parámetros</u> A	Valor	<u>ds</u> 1,26	$cina = A + V \cdot Tiempo$ $t \cdot ds$
Determinación de V por r Parámetros A	<i>Valor</i> 0,14	1,26 0,012	$\begin{aligned} & \text{Dina} = \mathbf{A} + \mathbf{V} & \text{Tiempo} \\ & & \underline{t \cdot ds} \\ & 2.34 \end{aligned}$
Determinación de V por r  Parámetros  A	<i>Valor</i> 0,14 0,725	1,26 0,012	$\begin{aligned} & \text{Dina} = \mathbf{A} + \mathbf{V} & \text{Tiempo} \\ & & \underline{t \cdot ds} \\ & 2.34 \end{aligned}$
Determinación de V por r  Parámetros  A  V  max  R = 0,999	<i>Valor</i> 0,14 0,725	1,26 0,012	$\begin{aligned} & \text{Dina} = \mathbf{A} + \mathbf{V} & \text{Tiempo} \\ & & \underline{t \cdot ds} \\ & 2.34 \end{aligned}$

Tabla 3.6.88. Actividad enzimática del lodo activado en presencia de Zn(II) (pH=7). Experimento: HG-14-2.

**	00 mg Gelatina/l		955 ± 20 mg/l
pH = 7	7,0 ± 0,1	$\Theta_{c} =$	10 d
T = 25	5,0 ± 0,1 °C	[Zn] =	1 mg/l
Tiemno	(min)	Glicina	(10 · M)
	15	- United	
	30		 
	45		
	60 75		<b>40,8 55</b> ,1
	90		64,0
1	05		
	20		84,0
	35 50		95,4
10	65		119,8
13			
1)			129,5
Determinación de V max	por regresión lineal de lo	s datos cinéticos: Glic	ina = A + V · Tiempo
Determinación de V max <u>Parámetros</u>	por regresión lineal de lo Valor	os datos cinéticos: Glic	$ina = A + V \cdot Tiempo$ $i \cdot ds$
Determinación de V max	por regresión lineal de lo	os datos cinéticos: Glic	ina = A + V · Tiempo
Determinación de V max <u>Parámetros</u>	por regresión lineal de lo Valor	os datos cinéticos: Glico ds	$ina = A + V \cdot Tiempo$ $i \cdot ds$
Determinación de V max <u>Parámetros</u> A	por regresión lineal de lo  Valor -1,91 0,730	ds datos cinéticos: Glico ds 1,77 0,014	$ina = A + V \cdot Tiempo$ $\frac{i \cdot ds}{3,43}$
Determinación de V max <u>Parámetros</u> A V max	por regresión lineal de lo  Valor -1,91 0,730  N =	ds datos cinéticos: Glico ds 1,77 0,014	$ina = A + V \cdot Tiempo$ $\frac{i \cdot ds}{3,43}$
Determinación de V max  Parámetros  A  V max  R = 0.99 DS = 1.56	por regresión lineal de lo  Valor -1,91 0,730  N =	ds datos cinéticos: Glico ds 1,77 0,014	$ina = A + V \cdot Tiempo$ $\frac{i \cdot ds}{3,43}$
Determinación de V max  Parámetros  A  V max  R = 0.99	por regresión lineal de lo  Valor -1,91 0,730  N =	ds datos cinéticos: Glico ds 1,77 0,014	$ina = A + V \cdot Tiempo$ $\frac{i \cdot ds}{3,43}$

Tabla 3.6.89. Actividad enzimática del lodo activado en presencia de Zn(II) (pH=7). Experimento: HG-14-3.

70 . 01	ielatina/l		T = 955 ± 20 m	ŭ
$pH = 7.0 \pm 0.1$			= 10 d	
$T = 25,0 \pm 0,1$	°C	[Zi	n] = 5 mg/l	
<u>Tiempo (min)</u>		Gli	s icina (10 · M)	
15		-	**	
30				
45			36,4	
60 75			43,8	
90			54,4 62,1	
105			75,4	
120			88,1	
135 150			96,1 108,1	
165			115,2	
180			128,6	
·				
Determinación de V por regre				· Tiempo
<u>Parámetros</u>	<u>Valor</u>	<u>ds</u>	<u>ı·ds</u>	· Tiempo ax
<u>Parámetros</u>				· Tiempo ax
<u>Parámetros</u> A	<u>Valor</u>	<u>ds</u>	<u>ı∵ds</u> 2,98	· Tiempo ax
<u>Parámetros</u> A V	<u>Valor</u> 2,97	1,63 0,014	<u>ı∵ds</u> 2,98	· Tiempo ax
<u>Parámetros</u> A V <sub>max</sub>	<u>Valor</u> 2,97 0,692	1,63 0,014	<u>ı∵ds</u> 2,98	· Tiempo ax
Parámetros A V max $R = 0.998$ $DS = 1.840$	<u>Valor</u> 2,97 0,692	1,63 0,014	<u>ı∵ds</u> 2,98	· Tiempo ax
$\frac{Par\'ametros}{A}$ $V_{max}$ $R = 0,998$	<u>Valor</u> 2,97 0,692	1,63 0,014	<u>ı∵ds</u> 2,98	· Tiempo

Tabla 3.6.90. Actividad enzimática del lodo activado en presencia de Zn(II) (pH=7). Experimento: HG-14-4.

[S] = 6000	mg Gelatina/l	SST =	$955 \pm 20 \text{ mg/l}$
pH = 7	± 0,1	$\theta_{c} =$	10 d
T = 25	± 0,1 °C		10 mg/l
Tiempo	(min)	Glicina	(10 · M)
15			
30			••
45			
60 75			39,1 52,8
90			64,9
105			63,3
120 135			78,2 84,5
150			94,0
165			105,1
180			
Determinación de V po	r regresión lineal de		cina = A + V · Tiempo
Determinación de V po max <u>Parámetros</u>	r regresión lineal de <u>Valor</u>	<u>ds</u>	cina = A + $V_{max}$ Tiempo $\underline{t \cdot ds}$
Determinación de V po max <u>Parámetros</u>	r regresión lineal de <u>Valor</u> 6,51	<u>ds</u> 4,21	cina = A + V · Tiempo
Determinación de V po	r regresión lineal de <u>Valor</u>	<u>ds</u> 4,21	cina = A + $V_{max}$ Tiempo $\underline{t \cdot ds}$
Determinación de V po max <u>Parámetros</u> A	r regresión lineal de <u>Valor</u> 6,51 0,589	4,21 0,036	cina = A + $V_{max}$ Tiempo $\frac{t \cdot ds}{7,98}$
Determinación de V po <u>Parámetros</u> A V max	r regresión lineal de <u>Valor</u> 6,51 0,589	4,21 0,036	cina = A + $V_{max}$ Tiempo $\frac{t \cdot ds}{7,98}$
Determinación de V po max  Parámetros  A  V max  R = 0,989	r regresión lineal de <u>Valor</u> 6,51 0,589	4,21 0,036	cina = A + $V_{max}$ Tiempo $\frac{t \cdot ds}{7,98}$

Tabla 3.6.91. Actividad enzimática del lodo activado en presencia de Zn(II) (pH=7). Experimento: HG-14-5.

$pH = 7.0 \pm 0$	.1	θ :	= 10 d	
$T = 25,0 \pm 0$		c [Zn] :		
			5	
<u>Tiempo (min</u>	1)	Glici	a (10 · M)	
15 30			••	
30 45			•• ••	
· 60				
75 90			48,3 52,3	
105			66,4	
120			71,4	
135 150			82,2	
165			97,3	
180			**	
10. 1 10. 10. 10. 10. 10. 10. 10. 10. 10	<del></del>			
Determinación de V por reg	gresión lineal de los	datos cinéticos: (	Slicina = A + V	· Tiempo
Determinación de V por reg max <u>Parámetros</u>	g <b>resión line</b> al <b>de l</b> os <u>Valor</u>	datos cinéticos: (	Glicina = A + V ma	· Tiempo
max Parámetros			má	· Tiempo x
max <u>Parámetros</u> A	<u>Valor</u>	<u>ds</u>		· Tiempo x
Max <u>Parámetros</u> A  V  max	<u>Valor</u> 4,76	<u>ds</u> 3,74 0,031		· Tiempo x
Parámetros  A  V max	<u>Valor</u> 4,76 0,564	<u>ds</u> 3,74 0,031		· Tiempo
Parámetros A V max $R = 0,994$	<u>Valor</u> 4,76 0,564	<u>ds</u> 3,74 0,031		· Tiempo

Tabla 3.6.92. Actividad enzimática del lodo activado en presencia de Zn(II) (pH=7). Experimento: HG-14-6.

[S] = 6000  mg	Gelatina/l		$\Gamma = 955 \pm 20 \text{ m}$	g/l
$pH = 7.0 \pm 0$	,1	θ	= 10 d	
$T = 25,0 \pm 0$	,1 °C	{Zn	] = 40 mg/l	
<u>Tiempo (min</u>	)	<u>Gli</u>	s cina (10 · M)	
15				
30 45			13,1 23,1	
60			29,4	
75			33,9	
90 105			52,1 56,4	
120			61,9	
135 150			74,9 	
165			88,8	
180				
	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·			<u>.</u>
max			ma	· Tiempo
Determinación de V por reg max Parámetros	resión lineal de los <u>Valor</u>	datos cinéticos:	Glicina = $A + V_{max}$	· Tiempo
Parámetros			ma	· Tiempo
Parámetros	<u>Valor</u>	<u>ds</u>	ma: 	· Tiempo x
Parámetros  A	<u>Valor</u> -3,83	2,39 0,024	ma: <u>t∵ds</u> 4,44	· Tiempo
Max  Parámetros  A  V  max	-3,83 0,567	2,39 0,024	ma: <u>t∵ds</u> 4,44	· Tiempo
$\frac{Par\'{a}metros}{A}$ $V_{max}$ $R = 0,994$	-3,83 0,567	2,39 0,024	ma: <u>t∵ds</u> 4,44	· Tiempo

Tabla 3.6.93. Actividad enzimática del lodo activado en presencia de Zn(II) (pH=8). Experimento: HG-15-1.

[S] = 6000  mg	Gelatina/l	SS	$\Gamma = 862 \pm 20$	mg/l
$pH = 8,0 \pm 0,$	1		= 10 d	
$T = 25.0 \pm 0.$	I °C		o] = 0 mg/l	l
Tiempo (min)	<u>L</u>	GI	cina (10 · M)	
15			7,7	
30			20,4	
45 60			38,5 47,1	
75			60,1	
90 105			62,6 76,4	
120			69,6	
135 150			84,6 96,0	
165			106,9	
180			114,1	
Determinación de V por regi	resión lineal de los	datos cinéticos:	Glicina = A + Y	V · Tiempo
Peterminación de V por regi max	resión lineal de los <u>Valor</u>	datos cinéticos:	Glicina = $A + \frac{t \cdot ds}{}$	V · Tiempo max
<u>Parámetros</u>				V · Tiempo max
<i>Parámetros</i> A	<u>Valor</u>	<u>ds</u>	<u>t · ds</u>	V · Tiempo max
<i>Parámetros</i> A V	<u>Valor</u> 6,67	<u>ds</u> 3,58 0,032	<u>t · ds</u> 6,43	V · Tiempo max
<i>Parámetros</i> A V max	<u>Valor</u> 6,67 0,602	<u>ds</u> 3,58 0,032	<u>t · ds</u> 6,43	V · Tiempo
$\frac{\text{max}}{Par\acute{a}metros}$ A V max $R = 0.986$	<u>Valor</u> 6,67 0,602	<u>ds</u> 3,58 0,032	<u>t · ds</u> 6,43	V · Tiempo max

Tabla 3.6.94. Actividad enzimática del lodo activado en presencia de Zn(II) (pH=8). Experimento: HG-15-2.

[S] = 6000  mg	Gelatina/l	SS	$\Gamma = 862 \pm 20$	) mg/l
$pH = 8.0 \pm 0.$	,1	θ	= 10 d	
$T = 25.0 \pm 0.$	1 °C	{Zr	] = 1 mg/	1
<u>Tiempo (min</u>	<u>).</u>	<u>Gli</u>	cina (10 · M)	
15			10,0	
30 45			25,9	
45 60			32,3	
75			53,8	
90 105			60,8 79,7	
120			89,8	
135 150			92,3 94,8	
165			113,3	
180			112,9	
Determinación de V por reg	resión lineal de los	datos cinéticos:	Glicina = A +	V · Tiempo
Determinación de V por reg max	resión lineal de los <u>Valor</u>	datos cinéticos:	Glicina = A + <u>t · ds</u>	V · Tiempo
max <u>Parámetros</u>				V · Tiempo max
max <u>Parámetros</u> A	<u>Valor</u>	<u>ds</u>	<u>t · ds</u>	V · Tiempo
max <u>Parámetros</u> A  V  max	<u>Valor</u> 5,47 0,636	3,43 0,030	<u>ı·ds</u> 6,21	V · Tiempo max
Max  Parámetros  A  V  max  R = 0,990	<u>Valor</u> 5,47	3,43 0,030	<u>ı·ds</u> 6,21	V · Tiempo max
$\frac{\text{max}}{Par\'{a}metros}$ A $V_{\text{max}}$ $R = 0,990$ $DS = 5,267$	<u>Valor</u> 5,47 0,636	3,43 0,030	<u>ı·ds</u> 6,21	V · Tiempo
$\frac{Par\'{a}metros}{A}$ $V$ $max$ $R = 0,990$	<u>Valor</u> 5,47 0,636	3,43 0,030	<u>ı·ds</u> 6,21	V · Tiempo max

Tabla 3.6.95. Actividad enzimática del lodo activado en presencia de Zn(II) (pH=8). Experimento: HG-15-3.

[S] = 6000  mg	Gelatina/l	SST	= 862 ± 20 s	mg/l
$pH = 8.0 \pm 0,$	1	$\theta_{c}$	= 10 d	
$T = 25.0 \pm 0$	1 °C	[Zn]	= 5 mg/l	
Tiempo (min)	)	Glici	1a (10 · M)	
15	<b>-</b>		5,0	
30			18,8	
45			32,2	
60 75			39,9 51,2	
90			62,1	
105			77,0	
120 135			82,2 85,7	
150			87,2	•
165 180			105,0 108,8	
Determinación de V por regi	resión lineal de lo	s datos cinéticos: (	Glicina = A + V	· Tiempo
	resión lineal de lo <u>Valor</u>	s datos cinéticos: (	•	· Tiempo
Determinación de V por regi			•	· Tiempo
Determinación de V por regi max	<u>Valor</u>	<u>ds</u>	t·ds	· Tiempo
Determinación de V por regu <u>Parámetros</u> A	<u>Valor</u> 2,94	3,30 0,030	t · ds 5,92	· Tiempo
Determinación de V por regu <u>Parámetros</u> A V max	<u>Valor</u> 2,94 0,615	3,30 0,030	t · ds 5,92	· Tiempo
Determinación de V por regr Parámetros  A  V max  R = 0,988	<u>Valor</u> 2,94 0,615	3,30 0,030	t · ds 5,92	· Tiempo

Tabla 3.6.96. Actividad enzimática del lodo activado en presencia de Zn(II) (pH=8). Experimento: HG-15-4.

[5] =	6000 mg Gelatina/l	SST =	$862 \pm 20 \text{ mg/l}$
pH =	8,0 ± 0,1	$\theta_{c} =$	10 d
T =	25,0 ± 0,1 °C		10 mg/l
<u>Tie</u>	mpo (min)	Glicina	(10 · M)
	15		5,5
	30		14,7
	45 60		27,1 34,2
	75		44,2
	90		55,7
	105 120		64,3 74,3
	135		79,8
	150		89,6
	165		98,1
	180		109,7
Determinación de V	por regresión lineal de	los datos cinéticos: Glie	······································
Determinación de V r <u>Parámetros</u>	por regresión lineal de	e los datos cinéticos: Glid	rina = A + V · Tiempo
r	por regresión lineal de	<u>ds</u>	cina = A + V · Tiempo
<u>Parámetros</u>	por regresión lineal de nax Valor	<u>ds</u> 1,01	$\sin a = A + V \cdot \text{Tiempo}$ $\frac{1 \cdot ds}{1 \cdot ds}$
Parámetros A V max	por regresión lineal de Valor -2,38	1,01 0,009	$\sin a = A + V_{\text{max}}$ Tiempo $\frac{t \cdot ds}{1,82}$
Parámetros A V max	por regresión lineal de Valor -2,38 0,620 0,999 N =	1,01 0,009	$\sin a = A + V_{\text{max}}$ Tiempo $\frac{t \cdot ds}{1,82}$
Parámetros  A  V  max  R =  DS =	por regresión lineal de Valor -2,38 0,620 0,999 N =	1,01 0,009	$\sin a = A + V_{\text{max}}$ Tiempo $\frac{t \cdot ds}{1,82}$

Tabla 3.6.97. Actividad enzimática del lodo activado en presencia de Zn(II) (pH=8). Experimento: HG-15-5.

_	S] = 6000 mg G			= 862 ±	20 mg/l
pł	$H = 8,0 \pm 0,1$		$\theta_{_{\mathbf{c}}}$	= 10 d	
-	$T = 25,0 \pm 0,1$	°C	(Zn)	= 20 n	ng/l
	Tiempo (min)		Glici	na (10 · M	L
	15				
	30				
	45 60			23,2 35,2	
	75			47,2	
	90			53,8	
	105 120			70,1 68,9	
	135			75,6	
	150			87,1	
	165 180			97,8	
	_		_		<u>.</u>
	n de V por regre	sión lineal de los	datos cinéticos:	Glicina = A	+ V · Tiempo
Determinación  Parámetros	1 de V por regre	esión lineal de los Valor	datos cinéticos:	Glicina = A	+ V Tiempo
Parámetros	1 de V por regre max				+ V Tiempo
Parámetros	1 de V por regre	Valor	ds	<u>t · ds</u>	+ V Tiempo
Parámetros A V max	max	<i>Valor</i> 0,73	3,79 0,034	<u>t·ds</u> 7,05	+ V · Tiempo
Parámetros A V max	max	0,73 0,584	3,79 0,034	<u>t·ds</u> 7,05	+ V · Tiempo
Parámetros  A  V  max  F	max $R = 0,988$	0,73 0,584	3,79 0,034	<u>t·ds</u> 7,05	+ V Tiempo

Tabla 3.6.98. Actividad enzimática del lodo activado en presencia de Zn(II) (pH=8). Experimento: HG-15-6.

	$pH = 8.0 \pm 0.1$		θ	= 10 d	
	$T = 25,0 \pm 0,1$	°C	(	: i] = 40 mg/	1
-	Tiempo (min)		Gli	cina (10 · M)	
	15			5,2	
	30			15,6	
	45 60			25,9 40,4	
	75 20			46,3	
	90 105				
	120			75,8 70.7	
	135 150			79,7 86,4	
	165 180			102,8 105,9	
·					
)etermina	ción de V por regres	sión lineal de l	os datos cinéticos:	Glicina = A +	V · Tiempo
Determina <u>Parámet</u>		sión lineal de l <u>Valor</u>	os datos cinéticos:	Glicina = $A + \frac{t \cdot ds}{a}$	V · Tiempo max
<u>Parámet</u>					V · Tiempo max
<u>Parámet</u> A		<u>Valor</u>	<u>ds</u>	<u>t·ds</u>	V · Tiempo max
<u>Parámet</u> A		<u>Valor</u> -0,92	<u>ds</u> 2,09	1 · ds 3,83	V · Tiempo
<i>Parámet</i> A	<u>ros</u>	-0,92 0,608	2,09 0,019	1 · ds 3,83	V · Tiempo max
<i>Parámet</i> A	R = 0.996	-0,92 0,608	2,09 0,019	1 · ds 3,83	V · Tiempo max

Tabla 3.6.99. Actividad enzimática del lodo activado en presencia de mezclas de Cu(II) y Zn(II) (pH=6).

Experimento: HG-16-1.

	[S] = 600	00 mg Gelatin	a/l		SST =	1.024	± 21 mg/l
	pH = 6	,0 ± 0,1			θ =	10	d
	T = 25	,0 ± 0,1 °C			[Cu] =	0	mg/l
					[2n] =	Ö	mg/l
	Tiempo	(min)			Glicina	(10	5 · M)
		15				11,6	<del></del>
	;	30				23,0	
		45 60				20.0	
		60 75				39,9 52,5	
	9	90				58,4	
		05				66,3	
		20 35				76,4 91,6	
		50				97,5	
		65 80				105,7 117,6	
					,		
Determinac	ión de V	por regresión l	ineal de	los datos cin	éticos: Gli	cina =	A + V · Tiempo
	ción de V	por regresión l					A + V · Tiempo max
Determinac <u>Parámetr</u>	ción de V	por regresión l	ineal de <u>Valor</u>		éticos: Gli	cina = <u>1 · ds</u>	A + V · Tiempo max
	ción de V	por regresión l					A + V · Tiempo
<u>Parámetr</u>	ción de V	por regresión l	<u>Valor</u>	1,	<u>ds</u>	<u>1 · ds</u>	A + V · Tiempo
<u>Parámetr</u> A V	ción de V		<u>Valor</u> 2,64	1, 0,0	<u>ds</u> 37	<u>1: ds</u> 2,49	A + V · Tiempo
<u>Parámetr</u> A V	ión de V max <u>os</u>	98	2,64 0,632	1, 0,0	<u>ds</u> 37	<u>1: ds</u> 2,49	A + V · Tiempo
<u>Parámetr</u> A V	ción de V max <u>os</u> R = 0,99	98 48	2,64 0,632	1, 0,0	<u>ds</u> 37	<u>1: ds</u> 2,49	A + V · Tiempo

Tabla 3.6.100. Actividad enzimática del lodo activado en presencia de mezclas de Cu(II) y Zn(II) (pH=6).

Experimento: HG-16-2.

	Gelatina/l		$T = 1.024 \pm 21 \text{ mg/}$	/1
$pH = 6.0 \pm 0$	,1		c = 10 d	
$T = 25.0 \pm 0$	,1 °C	[C	u] = 40 mg/l	
		[2.	n] = 1 mg/l	
<u>Tiempo (min</u>	·)	G	s icina (10 · M)	
<u> </u>	<u></u>			
30			13,8	
45			15,7	
60 75			24,3	
75 90			38,0 40,5	
105			49,0	
120			60,2	
135 · 150			60,9 70,3	
165			70,3 82,7	
180			85,8	
·——				
Determinación de V por reg max	resión lineal de	los datos cinéticos:	Glicina = A + V	Tiempo
Determinación de V por reg max Parámetros	resión lineal de Valor	los datos cinéticos:		Tiempo
			Glicina = $A + V_{max}$	Tiempo
<u>Parámetros</u> A	Valor	<u>ds</u>	Glicina = $A + V_{max}$ $t \cdot ds$	Tiempo
<u>Parámetros</u> A V	-3,71	2,13 0,018	Glicina = $A + V_{max}$ $t \cdot ds$ 3,86	Tiempo
Parámetros  A V max	-3,71 0,504	2,13 0,018	Glicina = $A + V_{max}$ $t \cdot ds$ 3,86	Tiempo
$\frac{Parámetros}{A}$ $V$ $max$ $R = 0,994$	-3,71 0,504	2,13 0,018	Glicina = $A + V_{max}$ $t \cdot ds$ 3,86	Tiempo

Tabla 3.6.101. Actividad enzimática del lodo activado en presencia de mezclas de Cu(II) y Zn(II) (pH=6).

Experimento: HG-16-3.

[S] = 6000 mg Gelatina/l	$SST = 1.024 \pm 21 \text{ mg/l}$
$pH = 6.0 \pm 0.1$	$\theta_c = 10 d$
$T = 25,0 \pm 0,1$ °C	[Cu] = 20  mg/l
	[Zn] = 5 mg/l
, <del>, , , , , , , , , , , , , , , , , , </del>	

iempo (min)	Glicina (10 M)
15	u.
30	J_ •
45	23,9
60	28,6
75	38,2
90	45,8
105	48,6
120	
135	66,6
150	
165	82,9
180	93,0

Determinación de  $V_{max}$  por regresión lineal de los datos cinéticos: Glicina =  $A + V_{max}$  Tiempo

<u>Parámetros</u>	<u>Valor</u>	<u>ds</u>	<u>ı · ds</u>
Α	-1,05	1,95	3,70
V max	0,510	0,017	0,032
R = 0,997	N = 8		
DS = 2,182			
P = 8,5E-08			

$$V = 2,99E-01 \pm 2,5E-02$$
 µ mol Glicina/mg SST·h

Tabla 3.6.102 Actividad enzimática del lodo activado en presencia de mezclas de Cu(II) y Zn(II) (pH=6).

Experimento: HG-16-4.

	Gelatina/l	$SST \approx 1.024 \pm 21 \text{ mg/i}$	
$pH = 6,0 \pm 0,$	1	$\theta_{c} = 10 \text{ d}$	
$T = 25.0 \pm 0,$	1 °C	[Cu] = 10  mg/l	
		$[Z\pi] = 10 \text{ mg/l}$	
<u>Tiempo (min)</u>		Glicina (10 · M)	
15		10,4	
30		20,6	
45 60		23,2 28,8	
75 20		40,3	
90 105		47,3 54,3	
120 135		61,3	
150		 	
165		<del></del>	
180		92,0	
	resión lineal de lo	92,0 os datos cinéticos: Glicina = A + V · Tiem	npo
	resión lineal de lo Valor	os datos cinéticos: Glicina = A + V · Tiem	npo
Determinación de V por regu max Parámetros		os datos cinéticos: Glicina = A + V · Tiem	npo
Determinación de V por regr max <u>Parámetros</u> A	<u>Valor</u>	os datos cinéticos: Glicina = A + V · Tiem $\frac{ds}{ds}$ $t \cdot ds$	npo
Determinación de V por regr max <u>Parámetros</u> A	<u>Valor</u> 2,65	os datos cinéticos: Glicina = A + V Tiem $\frac{ds}{max}$ $\frac{t \cdot ds}{1,24}$ 2,28 0,013 0,024	npo
Determinación de V por regr <u>Parámetros</u> A V max	2,65 0,492	os datos cinéticos: Glicina = A + V Tiem $\frac{ds}{max}$ $\frac{t \cdot ds}{1,24}$ 2,28 0,013 0,024	npo
Determinación de V por regr Parámetros  A V max  R = 0,997	2,65 0,492	os datos cinéticos: Glicina = A + V Tiem $\frac{ds}{max}$ $\frac{t \cdot ds}{1,24}$ 2,28 0,013 0,024	npo

Tabla 3.6.103. Actividad enzimática del lodo activado en presencia de mezclas de Cu(II) y Zn(II) (pH=6).

Experimento: HG-16-5.

[S] = 6000  mg	Gelatina/l	SS	$ST = 1.024 \pm 21 \text{ mg/l}$	
$pH = 6.0 \pm 0.$	.1	(	$\frac{\partial}{\partial c} = 10 \text{ d}$	
$T = 25.0 \pm 0,$	1 °C	(C	u] = 5  mg/l	
		{2	n] = 20  mg/l	
Tiempo (min)	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	G	icina (10 M)	
15	<u> </u>	_ <del></del>		
30			 	
45			16,2	
60			28,5	
75 90			39,4 	
105				
120				
135			66,9	
150 165			74,3 79,4	
180			91,7	
		<u>.                                    </u>		
Determinación de V por regi			Glicina = A + V · Ti	iempo
Determinación de V por regu max	<u>Valor</u>	<u>ds</u>	Glicina = $A + V$ To $\frac{t \cdot ds}{s}$	iempo
Determinación de V por regi Parámetros	<u>Valor</u> -3,64	<u>ds</u> 2,69	Glicina = $A + V_{max} \cdot T_{max}$ $\frac{t \cdot ds}{5.23}$	iempo
Determinación de V por regu max	<u>Valor</u>	<u>ds</u>	Glicina = $A + V$ To $\frac{t \cdot ds}{s}$	iempo
Determinación de V por regu <u>Parámetros</u> A	<u>Valor</u> -3,64	<u>ds</u> 2,69 0,021	Glicina = $A + V_{max} \cdot T_{max}$ $\frac{t \cdot ds}{5.23}$	iempo
Determinación de V por regi Parámetros  A  V max	<u>Valor</u> -3,64 0,521	<u>ds</u> 2,69 0,021	Glicina = $A + V_{max} \cdot T_{max}$ $\frac{t \cdot ds}{5.23}$	iempo
Determinación de V por regu Parámetros  A  V max  R = 0,996	<u>Valor</u> -3,64 0,521	<u>ds</u> 2,69 0,021	Glicina = $A + V_{max} \cdot T_{max}$ $\frac{t \cdot ds}{5.23}$	iempo

Tabla 3.6.104. Actividad enzimática del lodo activado en presencia de mezclas de Cu(II) y Zn(II) (pH=6).

Experimento: HG-16-6.

	Gelatina/l		$1.024 \pm 21 \text{ mg/l}$
$pH = 6.0 \pm 0.$	,1	$\theta_{c} =$	10 d
$T = 25.0 \pm 0.$	,1 °C	[Cu] =	1 mg/l
		{Zn} =	40 mg/l
Tiempo (min		Glicin	a (10 · M)
15	<u>-</u>	- Girm	
30			 8,3
45			19,1
60 75			28,9
75 90			42,7
105			54,9
120			58,5
135 150			66,1 74,1
165			79,8
180			91,8
		<del></del>	
max			$licina = A + V \cdot Tiempo$
max <u>Parámetros</u>	<u>Valor</u>	<u>ds</u>	max <u>t∙ds</u>
max <u>Parámetros</u>			max
max <u>Parámetros</u> A	<u>Valor</u>	<u>ds</u>	max <u>t∙ds</u>
max <u>Parámetros</u> A V	<u>Vator</u> -4,79 0,530	<u>ds</u> 1,68	1 · ds 3,08
max <u>Parámetros</u> A V <sub>max</sub>	<u>Vator</u> -4,79 0,530	1,68 0,014	1 · ds 3,08
$\frac{Par\acute{a}metros}{A}$ $V_{max}$ $R = 0,997$	<u>Vator</u> -4,79 0,530	1,68 0,014	1 · ds 3,08

Tabla 3.6.105. Actividad enzimática del lodo activado en presencia de mezclas de Cu(II) y Zn(II) (pH=7).

Experimento: HG-17-1.

	g Gelatina/l	$SST = 956 \pm 20 \text{ mg/l}$
$pH' = 7,0 \pm$	0,1	$\theta_{c} = 10 d$
$T = 25,0 \pm$	0,1 °C	[Cu = 0 mg/l
		[Zn] = 0  mg/l
Times (at	>	S (10 NA)
<u>Tiempo (mi</u> 15	m)_	Glicina (10 · M)
30		10,6 23,1
45		36,0
60 75		46,4 56,2
90		65,2
105 120		77,7 84,5
135		98,9
150 165		112,5
180		121,0 131,4
max		os datos cinéticos: Glicina = A + V · Tiempe
Determinación de V por re max Parámetros	gresión lineal de lo <u>Valor</u>	os datos cinéticos: Glicina = A + V · Tiempo $\frac{ds}{ds}$ · $\frac{i \cdot ds}{s}$
max		max
max <u>Parámetros</u>	<u>Valor</u>	<u>ds</u> <u>1 ds</u>
Parámetros  A	<u>Valor</u> 1,38	1,10 1,98 0,010 0,018
Parámetros  A  V  max	<u>Valor</u> 1,38 0,724	1,10 1,98 0,010 0,018
Parámetros  A  V  max  R = 0,999	<u>Valor</u> 1,38 0,724	1,10 1,98 0,010 0,018

Tabla 3.6.106. Actividad enzimática del lodo activado en presencia de mezclas de Cu(II) y Zn(II) (pH=7).

Experimento: HG-17-2.

	$[S] = 6000 \text{ mg C}$ $pH = 7.0 \pm 0.1$			$T = 956 \pm 20 \text{ r}$ $= 10 \text{ d}$	
				С	
	$T = 25,0 \pm 0,1$	°C	(C	u] = 40  mg/l	
				n] = 1 mg/1	
	<u>Tiempo (min)</u>		Gi	icina (10 · M)	
	15		<del></del>		
	30			••	
	45			25,5	
	60 75			32,9 46,8	
	90			49,3	
	105 120			57,9 72,0	
	135			75,2	
	150			91,1	
	165 180			92,1 98,3	
<del></del>					
	ación de V por regre				· Tiempo
Determina <u>Parámet</u>		esión lineal de <u>Valor</u>	los datos cinéticos:		· Tiempo ax
Parámet					· Tiempo ax
<u>Parámet</u> A		<u>Valor</u>	<u>ds</u>	<u>t · ds</u>	· Tiempo ax
<u>Parámet</u> A V		<u>Valor</u> 1,25	<u>ds</u> 3,02	<u>t · ds</u> 5,53	· Tiempo ax
<u>Parámet</u> A V	<u>eros</u>	1,25 0,559	3,02 0,025	<u>t · ds</u> 5,53	· Tiempo ax
<u>Parámet</u> A V	R = 0,992	1,25 0,559	3,02 0,025	<u>t · ds</u> 5,53	· Tiempo ax

Tabla 3.6.107. Actividad enzimática del lodo activado en presencia de mezclas de Cu(II) y Zn(II) (pH=7).

Experimento: HG-17-3.

[S] = 6000	mg Gelatina/l	SST =	$956 \pm 20 \text{ mg/l}$
$pH = 7,0 \pm$	0,1	$\theta_{c} =$	10 d
$T = 25,0 \pm$	0,1 °C	[Cu] =	20 mg/l
		{Zn} =	5 mg/l
<u>Tiempo</u> (r	nin)	Glicina	5 (10 · M)
15			••
30 45			13,8 18,1
60			
75 90			37,6 47,5
105			54,4
120 135			67,1 69,0
150			85,0
165 180			88,2
Determinación de V por	regresión lineal de los	datos cinéticos: Gl	icina = A + V · Tiempo
Determinación de V por max	regresión lineal de los <u>Valor</u>	datos cinéticos: Gl	icina = $A + V_{max}$ Tiempo
<u>Parámetros</u>			
<u>Parámetros</u> A	<u>Valor</u>	<u>ds</u>	<u>t · ds</u>
<u>Parámetros</u> A V	<u>Valor</u> -5,40	<u>ds</u> 2,30 0,021	<u>1 · ds</u> 4,27
<u>Parámetros</u> A V max	<u>Valor</u> -5,40 0,578	<u>ds</u> 2,30 0,021	<u>1 · ds</u> 4,27
A $V_{max}$ $R = 0,996$	<u>Valor</u> -5,40 0,578	<u>ds</u> 2,30 0,021	<u>1 · ds</u> 4,27

Tabla 3.6.108. Actividad enzimática del lodo activado en presencia de mezclas de Cu(II) y Zn(II) (pH=7).

Experimento: HG-17-4.

(S) =	6000 mg Gelatina/l	SST =	956 ± 20 mg/l
рН =	$7,0 \pm 0,1$	$\theta_{c} =$	10 d
T =	25,0 ± 0,1 °C	(Cu) =	10 mg/l
		[2n] =	10 mg/l
· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	·		——————————————————————————————————————

Tiempo (min)	Glicina (10 · M)
15	<del></del>
30	17,8
45	27,8
60	40,5
75	44,3
90	51,3
105	67,2
120	71,1
135	77,4
150	87,5
165	98,7
180	109,6

Determinación de  $V_{max}$  por regresión lineal de los datos cinéticos: Glicina =  $A + V_{max}$  Tiempo

<u>Parámetros</u>			ī	'alor		ds	$t \cdot ds$
Α				1,32		1,97	3,57
V max			0	,588		0,017	0,031
R	. =	0,996	٨	1 =	11		
DS	=	2,692					
P	· = 7	7,4E-11					

 $V = 3,69E-01 \pm 2,7E-02$   $\mu$  mol Glicina/mg SST·h

Tabla 3.6.109. Actividad enzimática del lodo activado en presencia de mezclas de Cu(II) y Zn(II) (pH=7).

Experimento: HG-17-5.

	ig Gelatina/l	$SST = 956 \pm 20 \text{ mg/l}$	
$pH = 7,0 \pm$	0,1	$\theta_{c} = 10 d$	
$T = 25,0 \pm$	0,1 °C	[Cu] = 5 mg/1	
		[Zn] = 20 mg/l	
<u>Tiempo (m</u>	in)_	Glicina (10 · M)	
15			
30		18,1	
45 60		28,0 37,7	
75			
90 105		53,6	
120		77,1	
135		87,0	
150 165		92,5 103,7	
180		110,8	
max		datos cinéticos: Glicina = A + V · Tie	empo
Determinación de V por re max	egresión lineal de los <u>Valor</u>	datos cinéticos: Glicina = A + $V_{\text{max}}$ . Tie	empo
max <u>Parámetros</u>		max	empo
max <u>Parámetros</u> A	<u>Valor</u>	max <u>ds</u> <u>1∴ds</u>	етро
Parámetros  A	<u>Valor</u> -0,33	$\frac{ds}{ds}$	епро
Parámetros  A  V  max	<u>Valor</u> -0,33 0,627	$\frac{ds}{ds}$	ешро
Parámetros  A  V  max  R = 0,999	<u>Valor</u> -0,33 0,627	$\frac{ds}{ds}$	етро

Tabla 3.6.110. Actividad enzimática del lodo activado en presencia de mezclas de Cu(II) y Zn(II) (pH=7).

Experimento: HG-17-6.

pН	$=$ 7,0 $\pm$ 0,1		(	9 = 10 d	
T		°C	ſĊ	c [u] = 1 n	ng/l
		-		[n] = 40 n	
	··· ··- <u>-</u>				
	Tiempo (min)		G	s licina (10 · M	n
	15				<u>a</u> _
	30			**	
	45 60			 26 1	
	75			36,1	
	90			56,2	
	105 120			59,7 72,7	
	135			77,8	•
	150 165			87,5 102,2	
	180			108,9	
<u> </u>					
Determinación d	le V por regre	sión lineal de	los datos cinéticos	: Glicina = A	+ V · Tiempo
Determinación c	le V por regre	sión lineal de <u>V</u> alor	los datos cinéticos	Glicina = A $\underline{t \cdot ds}$	+ V · Tiempo
	le V por regre max				+ V · Tiempo max
<u>Parámetros</u>	le V por regre	<u>Valor</u>	<u>ds</u>	<u>1 · ds</u>	+ V · Tiempo
<u>Parámetros</u> A V	le V por regre	<u>Valor</u> -0,94	<u>ds</u> 3,31	<u>t: ds</u> 6,28	+ V · Tiempo
<u>Parámetros</u> A V	max	<u>Valor</u> -0,94	<u>ds</u> 3,31	<u>t: ds</u> 6,28	+ V · Tiempo
Parámetros  A  V max	max	<u>Valor</u> -0,94 0,606	3,31 0,025	<u>t: ds</u> 6,28	+ V · Tiempo
Parámetros  A  V max  R ps	= 0,995	<u>Valor</u> -0,94 0,606	3,31 0,025	<u>t: ds</u> 6,28	+ V · Tiempo

Tabla 3.6.111. Actividad enzimática del lodo activado en presencia de mezclas de Cu(II) y Zn(II) (pH=8).

Experimento: HG-18-1.

:	[S] = 60	00 mg Gel	latina/l		SST =	993	± 21 r	ng/l
1	pH = 8	,0 ± 0,1			θ =	= 10	đ	
	T = 25	i,0 ± 0,1	°C		[Cu] =	- 0	mg/l	
					[Zn] =	= 0	mg/l	
***				<del></del>	·····	<del></del>	5	
	Tiempo	(min)			Glicin	a (10	<u>M)</u>	
		15						
		30 45				18,6		
		45 60				25,5 35,5		
	•	75				44,1		
		90 05				59,4		
		05 20				66,5 76,7		
		35				84,4		
		50				96,6		
	10	65				102,8		
	1	80						·
Determinaci	ón de V		ón lineal de	los datos o	cinéticos: G		A + V	· Tiempo
Determinacio	ón de V		ón lineal de <u>Valor</u>	los datos o	cinéticos: G		A + V	· Tiempo
	ón de V					licina =	A + V	· Tiempo
<u>Parámetro</u>	ón de V		<u>Valor</u>		<u>ds</u>	licina =	A + V	· Tiempo
<u>Parámetro</u> A V	ón de V	por regresi	<u>Valor</u> -2,21		<u>ds</u> 1,52	licina =	A + V	· Tiempo
<i>Parámetro</i> A V max	ón de V max	por regresi	-2,21 0,648	(	<u>ds</u> 1,52	licina =	A + V	· Tiempo
<i>Parámetro</i> A V max	on de V max  S  R = 0,99	por regresi 98	-2,21 0,648	(	<u>ds</u> 1,52	licina =	A + V	· Tiempo

Tabla 3.6.112. Actividad enzimática del lodo activado en presencia de mezclas de Cu(II) y Zn(II) (pH=8).

Experimento: HG-18-2.

[S] = 6000  mg C	Gelatina/l	SST :	$=$ 993 $\pm$ 21 mg/l
$pH = 8.0 \pm 0.1$		θ :	= 10 d
$T = 25,0 \pm 0,1$		c [Cu] :	
1 = 25,0 ± 0,1	C		_
		[Zn]	= 1 mg/l
Tiempo (min)		Glicir	na (10 · M)
15			8,9
30			15,6
45 60			27,1 37,5
75			43,3
90			55,9
105 120			
135			84,2
150			91,8
165 180			100,6
			<del></del>
Determinación de V por regre	esión lineal de los	datos cinéticos: (	Glicina = A + V · Tiempo
	esión lineal de los <u>Valor</u>	s datos cinéticos:	Glicina = A + V · Tiempo
Determinación de V por regro			Glicina = A + V · Tiempo
Determinación de V por regro max <u>Parámetros</u>	<u>Valor</u>	<u>ds</u>	Glicina = A + V · Tiempo max $\frac{i \cdot ds}{s}$
Determinación de V por regro max <u>Parámetros</u> A	<u>Valor</u> -1,27 0,623	<u>ds</u> 0,94	Glicina = $A + V$ Tiempo $\frac{i \cdot ds}{1,75}$
Determinación de V por regre <u>Parámetros</u> A V <sub>max</sub>	<u>Valor</u> -1,27 0,623	<u>ds</u> 0,94 0,009	Glicina = $A + V$ Tiempo $\frac{i \cdot ds}{1,75}$
Determinación de V por regreen	<u>Valor</u> -1,27 0,623	<u>ds</u> 0,94 0,009	Glicina = $A + V$ Tiempo $\frac{i \cdot ds}{1,75}$

Tabla 3.6.113. Actividad enzimática del lodo activado en presencia de mezclas de Cu(II) y Zn(II) (pH=8).

Experimento: HG-18-3.

	[S] = 6000	mg Gelatina/l	SST	= 993 ± 21 mg	/1
	$pH = 8.0 \pm$	0,1	$\theta_{c}$	= 10 d	
	$T = 25.0 \pm$	0,1 °C	[Cu]	= 20 mg/l	
			[Zn]	= 5 mg/l	
	<u>Tiempo (r</u>	nin)	Glici	na (10 · M)	· · · · · · · · · · · · · · · · · ·
	15			8,8	
	30			22,3	
	45 60			28,1 40,1	
	75			47,2	
	90 105			59,1 69,9	
	120				
	135				
	150			96,0 107,1	
	165				
	165 180			115,5	
Determina	180	regresión lineal de	los datos cinéticos:	115,5	Tiempo
Determina <u>Paráme</u>	ación de ${f V}_{f max}$ por	regresión lineal de <u>Valor</u>	los datos cinéticos:	115,5  Glicina = A + V	Tiempo
	ación de ${f V}_{f max}$ por			115,5  Glicina = A + V  max	Tiempo
<u>Paráme</u>	ación de ${f V}_{f max}$ por	<u>Valor</u>	<u>ds</u>	$115.5$ Glicina = A + V  max $\underline{t \cdot ds}$	Tiempo
<u>Paráme</u> A V	ación de ${f V}_{f max}$ por	<u>Valor</u> 0,75	<u>ds</u> 0,95	$115.5$ Glicina = A + V $\frac{t \cdot ds}{1.74}$	Tiempo
<u>Paráme.</u> A V	ación de V por max	<u>Valor</u> 0,75 0,641	<u>ds</u> 0,95 0,009	$115.5$ Glicina = A + V $\frac{t \cdot ds}{1.74}$	Tiempo
<u>Paráme.</u> A V	ación de $V_{max}$ por $tros$	<u>Valor</u> 0,75 0,641	<u>ds</u> 0,95 0,009	$115.5$ Glicina = A + V $\frac{t \cdot ds}{1.74}$	Tiempo

Tabla 3.6.114. Actividad enzimática del lodo activado en presencia de mezclas de Cu(II) y Zn(II) (pH=8).

Experimento: HG-18-4.

[S] = 6000 mg Gelatina/l	$SST = 993 \pm 21 \text{ mg/l}$
$pH = 8.0 \pm 0.1$	$\theta_c = 10 d$
$T = 25,0 \pm 0,1$ °C	[Cu] = 10 mg/l
	[Zn] = 10 mg/l

<u> Fiempo (min)</u>	Glicina (10 · M)
15	••
30	
45	33,7
60	45,5
75	49,1
90	62,8
105	
120	81,1
135	91,2
150	103,1
165	
180	121,4

Determinación de  $V_{max}$  por regresión lineal de los datos cinéticos: Glicina =  $A + V_{max}$  Tiempo

<u>Parámetros</u>	<u>Valor</u>	<u>ds</u>	<u>ı ds</u>
A	3,76	1,84	3,49
V <sub>max</sub>	0,652	0,016	0,030
R = 0,998	N = 8		
DS = 1,983			
P = 1.4E-08			

$$V = 3,94E-01 \pm 2,6E-02$$
 µ mol Glicina/mg SST · h

Tabla 3.6.115. Actividad enzimática del lodo activado en presencia de mezclas de Cu(II) y Zn(II) (pH=8).

Experimento: HG-18-5.

	5] = 6000	mg Gelatina/l		SST =	$993 \pm 21 \text{ mg/l}$
p)	H = 8,0	± 0,1		$\theta_{c} =$	10 d
•	T = 25,0	± 0,1 °C		[Cu] =	5 mg/l
				[Zn] =	20 mg/l
	Tiempo	(min)		Glicina	(10 · M)
	15				
	30				26,1
	45				30,0
	60 75				45,5 53,0
	90				63,8
	105				68,8
	120 135				84,2 88,7
	150				••
	165 180				••
Determinación	n de V po	r regresión lineal c	le los datos cir	eticos: Gli	cina = A + V · Tiem
Determinación	n de V po	er regresión lineal c		éticos: Glie	$cina = A + V \cdot Tien$ $\frac{t \cdot ds}{a}$
<u>Parámetros</u>	n de V po		<u>:</u>		max
<u>Parámetros</u> A	n de V po	<u>Valor</u>	2	<u>ds</u> ,55	<u> 1 · ds</u>
<u>Parámetros</u> A V <sub>max</sub>	n de V po max R = 0,994	<u>Valor</u> 5,79 0,627	2 0,0	<u>ds</u> ,55	<u>t · ds</u> 4,84
<u>Parámetros</u> A V <sub>max</sub>	max	<u>Valor</u> 5,79 0,627	2 0,0	<u>ds</u> ,55	<u>t · ds</u> 4,84
<u>Parámetros</u> A V max D	max R = 0,994	<u>Valor</u> 5,79 0,627	2 0,0	<u>ds</u> ,55	<u>t · ds</u> 4,84

Tabla 3.6.116. Actividad enzimática del lodo activado en presencia de mezclas de Cu(II) y Zn(II) (pH=8).

Experimento: HG-18-6.

рН =	8,0 ± 0,1		6	) = 10 d	
T =		°C		c u] = 1 mg/l	
, –	23,0 ± 0,1				
			[2:	n] = 40 mg/l	
Т	iempo (min)		GI	icina (10 · M)	
-	15				
	30			18,5	
	45 60			26,2 	
	75			••	
	90			54,9	
	105 120			62,5 78,5	
	135			82,4	
	150 165			95,3 104,4	
	180			109,8	
Determinación de			los datos cinéticos:	Glicina = A + V	· Tiempo
Determinación de Parámetros		sión lineal de <u>Valor</u>	los datos cinéticos:		7 · Tiempo
<u>Parámetros</u>				Glicina = A + V	7 · Tiempo
<u>Parámetros</u> A		<u>Valor</u>	<u>ds</u>	Glicina = A + V $\underline{t \cdot ds}$	' · Tiempo
<i><u>Parámetros</u></i> A V	V por regres	<u>Valor</u> -1,27	<u>ds</u> 2,00	Glicina = $A + V$ $\frac{t \cdot ds}{3,73}$	7 · Tiempo
<u>Parámetros</u> A V max	V por regres	<u>Valor</u> -1,27 0,631	2,00 0,016	Glicina = $A + V$ $\frac{t \cdot ds}{3,73}$	' · Tiempo
Parámetros  A  V max  R = DS =	V por regres	<u>Valor</u> -1,27 0,631	2,00 0,016	Glicina = $A + V$ $\frac{t \cdot ds}{3,73}$	7 · Tiempo

Tabla 3.6.117. Comparación entre la inhibición enzimática causada por el Cu(II) y el Zn(II) sobre lodo de 10 días de edad.

Experimento: HG-19-1.

	[S] = 6000	mg Gelatina/l		$SST = 695 \pm 1$	9 mg/l
	pH = 7,0	± 0,1		$\theta_c = 10 d$	
	T = 25,0	± 0,1 °C		[Cu] = 0 mg	/l
				[Zn] = 0 mg	/1
	Tiempo	(min)		Glicina (10 · M)	`
	15				
	30 45			13,7 21,6	
	60			31,8	
	75 90			40,4 48,7	
	105			54,4	
	120 135			63,5	
	150			77,0	
	165 180			85,8 90,5	
Determina		or regresión lineal de	los datos cinétic	os: Glicina = A +	V · Tiempo
Determina <u>Paráme</u> t	ación de V po	or regresión lineal de <u>Valor</u>	los datos cinétic	os: Glicina = A +	V · Tiempo
	ación de V po				V · Tiempo
<u>Paráme</u> i	ación de V po	<u>Valor</u>	<u>ds</u>	<u>ı · ds</u>	V · Tiempo max
<i>Parámet</i> A V	ación de V po	<u>Valor</u> 0,20 0,515	<u>ds</u> 1,25 0,011	<i>1∙ds</i> 2,29	V · Tiempo
<i>Parámei</i> A V	ación de V po max tros	<u>Valor</u> 0,20 0,515 N =	<u>ds</u> 1,25 0,011	<i>1∙ds</i> 2,29	V · Tiempo
<i>Parámei</i> A V	ación de V po max rros R = 0,998	<u>Valor</u> 0,20 0,515 N =	<u>ds</u> 1,25 0,011	<i>1∙ds</i> 2,29	V · Tiempo

Tabla 3.6.118. Comparación entre la inhibición enzimática causada por el Cu(II) y el Zn(II) sobre lodo de 10 días de edad.

Experimento: HG-19-2.

	g Gelatina/I		$\Gamma = 695 \pm 19 \text{ n}$	•••b· •
$pH = 7.0 \pm 0$	0,1	θ	= 10 d	
$T = 25,0 \pm 0$	0,1 °C	[Cu	] = 20 mg/l	
<u>Tiempo (mir</u>	<u>n)</u>	<u>.Gli</u>	cina (10 · M)	
15				
30			11,8	
45			15,7	
60 75			21,7 30,4	
90			33,7	
105			39,7	
120 135			 48,5	
150			55,0	
165 180			60,5	
			66,8	
	· · ·			
Determinación de V por re			Glicina = A + V	· Tiempo
	gresión lineal de los <u>Valor</u>	datos cinéticos:		· Tiempo ax
Determinación de V por re max <u>Parámetros</u>			Glicina = A + V	· Tiempo ax
Determinación de V por remax  Parámetros	<u>Valor</u>	<u>ds</u>	Glicina = A + V $\underline{t \cdot ds}$	· Tiempo ax
Determinación de V por remax  Parámetros  A	<u>Valor</u> 0,68	<u>ds</u> 0,87 0,008	Glicina = A + V $\frac{t \cdot ds}{1,6}$	· Tiempo
Determinación de V por remax  Parámetros  A V max	<u>Valor</u> 0,68 0,364	<u>ds</u> 0,87 0,008	Glicina = A + V $\frac{t \cdot ds}{1,6}$	· Tiempo
Determinación de V por remax  Parámetros  A  V max  R = 0,998	<u>Valor</u> 0,68 0,364	<u>ds</u> 0,87 0,008	Glicina = A + V $\frac{t \cdot ds}{1,6}$	· Tiempo

Tabla 3.6.119. Comparación entre la inhibición enzimática causada por el Cu(II) y el Zn(II) sobre lodo de 10 días de edad.

Experimento: HG-19-3.

<b>T</b> =	25,0 ± 0,1 °C		[Zn] =	20 mg/l	
<u> </u>					
<u> 1</u>	<u> Tiempo (min)</u>		Glicina	(10 · M)	
	15				
	30 45			11,9	
	45 60			17,5 27,4	
	75			32,3	
	90			36.4	
	105 120			46,9 54,0	
	135			57,3	
	150			61,6	
	165			71,2	
Determinación de	V por regresión line	nal da los d	latos sináticos: Gl	77,4	Tiempo
Determinación de	V por regresión line	al de los d	latos cinéticos: Gl		· Tiempo
Determinación de <u>Parámetros</u>	V por regresión line	eal de los d	latos cinéticos: Gl		· Tiempo
<u>Parámetros</u>	V por regresión line max			icina = A + V	· Tiempo
<u>Parámetros</u> A	V por regresión line	'alor	<u>ds</u>	icina = A + V	· Tiempo
<u>Parámetros</u> A V max	V por regresión line  v v v v v v v v v v v v v v v v v v v	<u>alor</u> 0,44	<u>ds</u> 1,32	icina = A + $\frac{1 \cdot ds}{2.4}$	Tiempo
Parámetros  A  V  max  R =	V por regresión line  v v v v v v v v v v v v v v v v v v v	0,44 ,432	<u>ds</u> 1,32	icina = A + $\frac{1 \cdot ds}{2.4}$	· Tiempo

Tabla 3.6.120. Comparación entre la inhibición enzimática causada por el Cu(II) y el Zn(II) sobre lodo de 14 días de edad.

Experimento: HG-19-4.

[S] =	6000 mg Gelatina/l	sst =	651 ± 14 mg/l
pH =	7,0 ± 0,1	$\theta_{c} =$	14 d
T =	25,0 <u>± 0,1</u> °C	[Cu =	0 mg/l
		{Zn}=	0 mg/l
			5

Tiempo (min)	Glicina (10 · M)
15	
30	19,9
45	27,2
60	42,0
75	49,9
90	61,9
105	73,2
120	86,0
135	91,4
150	105,0
165	114,3
180	

Determinación de  $V_{max}$  por regresión lineal de los datos cinéticos: Glicina =  $A + V_{max}$  Tiempo

<u>Farametros</u>	<u>vaior</u>	as	<u>1 as</u>	
A	-2,28	1,43	2,62	
V max	0,711	0,013	0,025	
R = 0.	999 N =	10		

$$R = 0.999$$
  $N = 10$ 
 $DS = 1.827$ 
 $P = 1.8E-11$ 

$$V = 6,56E-01 \pm 3,7E-02$$
 µ mol Glicina/mg SST · h

Tabla 3.6.121. Comparación entre la inhibición enzimática causada por el Cu(II) y el Zn(II) sobre lodo de 14 días de edad.

Experimento: HG-19-5.

-ti - 70 :	mg Gelatina/l	$SST = 651 \pm 14 \text{ mg/l}$ $\theta = 14 \text{ d}$	
$pH = 7.0 \pm$		c	
T = 25,0 ±	- 0,1 °C	[Cu] = 20 mg/l	
Tiempo (r	min)	Glicina (10 · M)	
15		5,8	
30		15,3	
45		20,2	
60		27,4	
75 90		<b>40</b> ,9 <b>48</b> ,1	
105		50,0	
120		58,8	
135 150		70,3 	
165		79,5	
180		89,3	
Determinación de V por	regresión lineal de los	s datos cinéticos: Glicina = A + V · Tie	етро
Determinación de V por max	regresión lineal de los <u>Valor</u>	datos cinéticos: Glicina = A + $V$ Tiemax $\frac{ds}{ds}$ $\frac{t \cdot ds}{ds}$	етро
Parámetros		max	ешро
<u>Parámetros</u> A	<u>Valor</u>		етро
Parámetros  A V max	-0,45 0,501	1,60 2,89 0,015 0,027	етро
max ` <u>Parámetros</u> A	<u>Valor</u> -0,45	1,60 2,89 0,015 0,027	етро
Parámetros  A  V max  R = 0,996	-0,45 0,501	1,60 2,89 0,015 0,027	етро

Tabla 3.6.122. Comparación entre la inhibición enzimática causada por el Cu(II) y el Zn(II) sobre lodo de 14 días de edad.

Experimento: HG-19-6.

$pH = 7 \pm 0.1$		9	= 14 d	
$T = 25 \pm 0.1$	°C	[Zn	] = 20 mg/l	
<u>Tiempo</u> (min)		_Glie	s cina (10 · M)	
15				
30				
45			21,8	
60 75			34,6	
73 90			39,4 48,0	
105			63,2	
120			64,9	
135			68,3	
150 165			80,5	
180			 99,6	
	esión lineal de los	datos cinéticos:		· Tiempo
Determinación de V por regre	esión lineal de los <u>Valor</u>	datos cinéticos:	Glicina = A + V	· Tiempo
Determinación de V por regre max			Glicina = A + V	· Tiempo
Determinación de V por regre max Parámetros A	<u>Valor</u>	<u>ds</u>	Glicina = $A + V_{ma}$ $\underline{t \cdot ds}$	· Tiempo
Determinación de V por regre max <u>Parámetros</u> A	<u>Valor</u> -0,55	<u>ds</u> 3,13 0,027	Glicina = A + $V_{ma}$ $\frac{t \cdot ds}{5.81}$	· Tiempo
Determinación de V por regre <u>Parámetros</u> A V max	<u>Valor</u> -0,55 0,547	<u>ds</u> 3,13 0,027	Glicina = A + $V_{ma}$ $\frac{t \cdot ds}{5.81}$	х Тієтро
Determinación de V por regre  Parámetros  A  V  max  R = 0,991	<u>Valor</u> -0,55 0,547	<u>ds</u> 3,13 0,027	Glicina = A + $V_{ma}$ $\frac{t \cdot ds}{5.81}$	. Tiempo

Tabla 3.6.123. Comparación entre la inhibición enzimática causada por el Cu(II) y el Zn(II) sobre lodo de 10 días de edad.

Experimento: HG-20-1.

	Gelatina/l	$SST = 661 \pm 20 \text{ mg}$	/1
$pH = 7,0 \pm 0,$	1	$\theta_{c} = 10 \text{ d}$	
$T = 25,0 \pm 0,$	1 °C	[Cu] = 0 mg/l	
		[Zn] = 0 mg/l	-
Tiempo (min)	_	Gliçina (10 · M)	
15			
30		11,5	
45 60		21,7 26,4	
75 00		35,7	
90 105		42,0 49,3	
120 135		56,3	
150		63,9 68,9	
165		77,2	
		82,9	_
Determinación de V por regr		datos cinéticos: Glicina = A + V	Tiempo
Determinación de V por regr	resión lineal de los d <u>Valor</u>	datos cinéticos: Glicina = A + V	Tiempo
Determinación de V por regr max <u>Parámetros</u>		datos cinéticos: Glicina = A + V	Tiempo
Determinación de V por regr max <u>Parámetros</u> A	<u>Valor</u>	datos cinéticos: Glicina = A + V may $\underline{ds} \qquad \underline{t \cdot ds}$	Tiempo
Determinación de V por regr <u>Parámetros</u> A	<u>Valor</u> -0,75	datos cinéticos: Glicina = A + V may $\frac{ds}{0.84} \frac{t \cdot ds}{1.52}$	Tiempo
Determinación de V por regr <u>Parámetros</u> A V max	<u>Valor</u> -0,75 0,471	datos cinéticos: Glicina = A + V may $\frac{ds}{0.84} \frac{t \cdot ds}{1.52}$	Tiempo
Determinación de V por regr <u>Parámetros</u> A  V <sub>max</sub> R = 0,999	<u>Valor</u> -0,75 0,471	datos cinéticos: Glicina = A + V may $\frac{ds}{0.84} \frac{t \cdot ds}{1.52}$	Tiempo

Tabla 3.6.124. Comparación entre la inhibición enzimática causada por el Cu(II) y el Zn(II) sobre lodo de 10 días de edad.

Experimento: HG-20-2.

$pH = 7.0 \pm 0$	),1	$\theta = 10 d$	
$T = 25.0 \pm 0$		[Cu] = 20 mg/l	
Tiempo (mir	n)	Glicina (10 · M)	
15	<del></del>		
30		12.3	
45 60		18,5 26,9	
75		28,2	
90 105		34,3	
120		 45,5	
135			
150 165		 56,5	
180		62,1	
_,	<u> </u>		
		datos cinéticos: Glicina = $A + V$ . $t \cdot ds$	Tiempo
<u>Parámetros</u>	<u>Valor</u>	<u>ds</u> <u>i∴ds</u>	Tiempo
<u>Parámetros</u> A			Tiempo
<u>Parámetros</u> A	<u>Valor</u> 4,79	<u>ds</u> <u>1∴ds</u> 1,38 2,62 0,013 0,024	Tiempo
<u>Parámetros</u> A V <sub>max</sub>	<u>Valor</u> 4,79 0,322	<u>ds</u> <u>1∴ds</u> 1,38 2,62 0,013 0,024	Tiempo
$\begin{array}{c} \underline{Parámetros} \\ A \\ V \\ max \\ R = 0.995 \end{array}$	<u>Valor</u> 4,79 0,322	<u>ds</u> <u>1∴ds</u> 1,38 2,62 0,013 0,024	Tiempo

Tabla 3.6.125. Comparación entre la inhibición enzimática causada por el Cu(II) y el Zn(II) sobre lodo de 10 días de edad.

Experimento: HG-20-3.

	6000 mg Gelatina/l		661 ± 20 mg/l
pH =	$7,0 \pm 0,1$	$\theta_{c} =$	10 d
T =	25,0 ± 0,1 °C	[Zn] =	20 mg/l
Tien	ıpo (min)	Glicina	5 (10 · M)
	15		<del></del>
	30		<b></b>
	45		18,1
	60 75		23,5
	90		35,0
	105 120		41,0 45,5
	135		51,6
	150		
	165 <sup>-</sup> 180		62,1 67,8
Determinación de V	por regresión lineal de le	os datos cinéticos: Glic	ina = A + V · Tiempo
Determinación de V mi <u>Parámetros</u>	por regresión lineal de lo x <u>Valor</u>	os datos cinéticos: Glio	$\sin a = A + V \cdot \text{Tiempo}$ $\underline{t \cdot ds}$
Parámetros	ax	ds	max
mi <i>Parámetros</i> A	Valor	<u>ds</u> 0,37	max 1 · ds
P <u>arámetros</u> A V	1,73 0,368	0,37 0,003	1 · ds 0.69
Parámetros A V max	1,73 0,368 1,000 N =	0,37 0,003	1 · ds 0.69
Parámetros  A  V max  R =	1,73 0,368 1,000 N =	0,37 0,003	1 · ds 0.69

Tabla 3.6.126. Comparación entre la inhibición enzimática causada por el Cu(II) y el Zn(II) sobre lodo de 14 días de edad.

Experimento: HG-20-4.

<u> </u>	g Gelatina/l	$SST = 610 \pm 13 \text{ mg/l}$	
$pH = 7.0 \pm 6$		$\theta_{c} = 14 d$	
$T = 25.0 \pm 6$	0,1 °C	[Cu] = 0 mg/l	
		[Zn] = 0 mg/l	
<u>Tiempo (mi</u>	n)_	Glicina (10 · M)	
15			
30		<del>_</del>	
45 60		26,9 41,6	
75		51,5	
90		61,8	
105 120		78,9 85,1	
135		87,2	
150 165		106,7 111,6	
180		118,8	
		, , , , , , , , , , , , , , , , , , ,	- du
Determinación de V por re		os cinéticos: Glicina = A + V · Tien	mpo
	gresión lineal de los dat <u>Valor</u>		тро
Determinación de V por re max <u>Parámetros</u>		os cinéticos: Glicina = A + V · Tien	mpo
Determinación de V por re max <u>Parámetros</u> A	<u>Valor</u>	os cinéticos: Glicina = $A + V$ Tien $\frac{ds}{ds}$	тро
Determinación de V por re max <u>Parámetros</u> A	<u>Valor</u> 0,85	os cinéticos: Glicina = $A + V_{max}$ Tien $\frac{ds}{3,66}$	mpo
Determinación de V por re max <u>Parámetros</u> A V max	<u>Valor</u> 0,85 0,677	os cinéticos: Glicina = $A + V_{max}$ Tien $\frac{ds}{3,66}$	тро
Determinación de V por re  Parámetros  A  V  max  R = 0,992	<u>Valor</u> 0,85 0,677	os cinéticos: Glicina = $A + V_{max}$ Tien $\frac{ds}{3,66}$	mpo

Tabla 3.6.127. Comparación entre la inhibición enzimática causada por el Cu(II) y el Zn(II) sobre lodo de 14 días de edad.

Experimento: HG-20-5.

pH = 0	70 + 01	θ =	14 d
_		0 <sub>c</sub> –	
T = 25	5,0 ± 0,1 °C	(Cu) =	20 mg/l
Tiempo	o (min)	Glicina	(10 · M)
	15		
	30		<b></b>
	45 60		18,6 27,3
	75		30,5
	90		42,3
	05		49,6
	20		50,3
	35 50		57,8 70,4
	65		79,2
	80		81,9
	por regresión lineal de los	s datos cinéticos: Glie	
Determinación de V		s datos cinéticos: Glic	cina = A + V · Tiempo
Determinación de V max <u>Parámetros</u>	por regresión lineal de los		cina = A + V · Tiempo
Determinación de V max <u>Parámetros</u> A	por regresión lineal de los <u>Valor</u>	<u>ds</u> 2,52	
Determinación de V max <u>Parámetros</u> A	por regresión lineal de los <u>Valor</u> -2,83 0,477	2,52 0,021	$cina = A + V  Tiempo$ $\frac{t \cdot ds}{4.61}$
Determinación de V max <u>Parámetros</u> A V max	por regresión lineal de los  Valor  -2,83 0,477  N = 1	2,52 0,021	$cina = A + V  Tiempo$ $\frac{t \cdot ds}{4.61}$
Determinación de V max  Parámetros  A  V max  R = 0,9	por regresión lineal de los <u>Valor</u> -2,83 0,477  92 N = 1	2,52 0,021	$cina = A + V  Tiempo$ $\frac{t \cdot ds}{4.61}$

Tabla 3.6.128. Comparación entre la inhibición enzimática causada por el Cu(II) y el Zn(II) sobre lodo de 14 días de edad.

Experimento: HG-20-6.

[S] =	6000 mg Gelatina/l	$SST = 610 \pm 13 \text{ mg/l}$
pH =	7 ± 0,1	$\theta_{c} = 14 \text{ d}$
<b>T</b> =	25 ± 0,1 °C	[Zn] = 20 mg/l
	<u>-</u> .	

Tiempo (min)	Glicina (10 · M)
15	<b></b>
30	18,1
45	33,2
60	35,4
75	41,1
90	55,8
105	68,9
120	80,2
135	85,5
150	90,8
165	91,9
180	97,3

Determinación de  $V_{max}$  por regresión lineal de los datos cinéticos: Glicina =  $A + V_{max}$  Tiempo

<u>Parámetros</u>	Valor	<u>ds</u>	<u>t · ds</u>
Α	5,55	4,12	7,46
V max	0,552	0,036	0,065
R = 0,982	N = 11		
DS = 5,625			
P = 8.8E-08			

 $V = 5,42E-01 \pm 7,6E-02$  µ mol Glicina/mg SST·h

## IV.1. Selección del sustrato y de su nivel de saturación.

Los resultados experimentales obtenidos en el estudio de la influencia del tipo y concentración de sustrato sobre la actividad enzimática del lodo activado (apartado III.6.1), se recogen, gráficamente, en las figuras 4.1, para el caso de la caseína, y 4.2, para el de la gelatina.

En la primera, manteniendo constante la concentración de lodo activado, la concentración de grupos amino libres, expresado como concentración en mol/l de glicina, crece al incrementarse el tiempo de reacción y la concentración de caseína, lo que demuestra el aumento de la velocidad de hidrólisis, tal y como predice el modelo cinético representativo de este tipo de reacciones. Se alcanza el máximo para una concentración de caseína de 4.000 mg/l, a partir de la cual la velocidad de hidrólisis se hace independiente de dicha concentración, por lo que se trata de la de saturación.

Por su parte, el análisis de los resultados correspondientes a la hidrólisis de la gelatina con concentraciones entre 2.000 y 10.000 mg/l, manteniendo la de lodo activado en 983±19 mg SST/l, indica un comportamiento similar al descrito para la caseína; sin embargo, en este caso, la concentración de saturación del sustrato se sitúa en 6.000 mg/l.

Para justificar la selección del sustrato y del nivel de concentración definido en los ensayos posteriores de este trabajo de investigación, se han representado y ajustado por regresión lineal los datos cinéticos correspondientes a las concentraciones de saturación de los dos sustratos calculándose, además, las velocidades máximas específicas de hidrólisis  $(V_{max e})$ .

Los resultados obtenidos se recogen en la figura 4.3 así como en las tablas 4.1 y 4.2. El análisis de estos resultados pone de manifiesto el buen ajuste de los datos experimentales al modelo líneal seleccionado, con valores del coeficiente de correlación de 0,998 significativos a P<10<sup>-10</sup>, lo que confirma la tesis defendida en esta memoria según la cual la valoración de los grupos amino libres de los péptidos producidos como

intermedios de reacción en la hidrólisis de las proteínas puede ser utilizada para determinar la actividad de las proteasas bacterianas y, por tanto, la del propio lodo activado. Por otra parte, la velocidad máxima específica de hidrólisis de la caseína se sitúa en 0,203±0,011 µmol Glicina/mg SST·h frente a los 0,459±0,023 µmol Glicina/mg SST·h que corresponden a la de la gelatina. Es decir, la utilización de gelatina como sustrato implica mayor sensibilidad del método propuesto para el seguimiento de la actividad del lodo activado.

En consecuencia, para todos los experimentos posteriores de este trabajo de investigación se utilizará como sustrato gelatina a una concentración de 6.000 mg/l y lodo activado en concentración siempre inferior a 1 g SST/l, con objeto de asegurar la saturación de los enzimas por el sustrato.



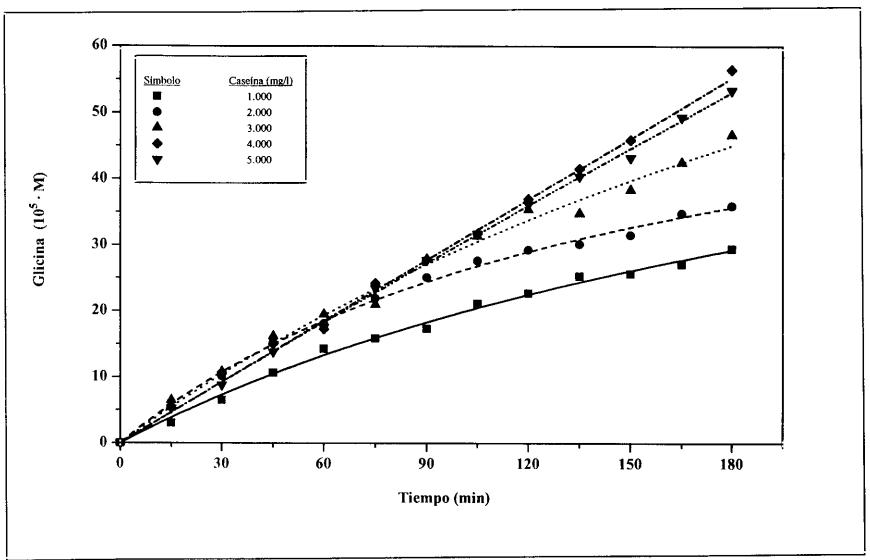


Figura 4.1. Hidrólisis de caseína con  $900 \pm 21$  mg SST/l de lodo activado de 10 días de edad a pH=7 y T=25°C.

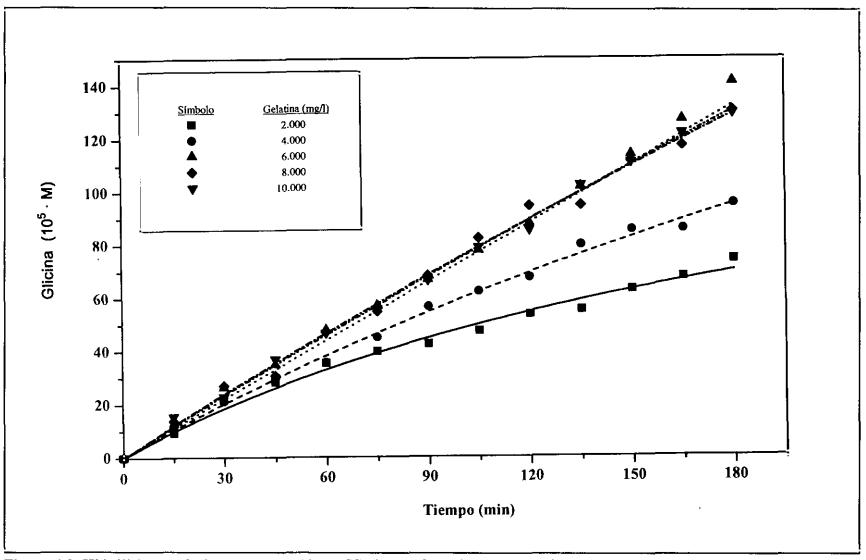


Figura 4.2. Hidrólisis de gelatina con 983 ± 19 mg SST/l de lodo activado de 10 días de edad a pH=7 y T=25°C.

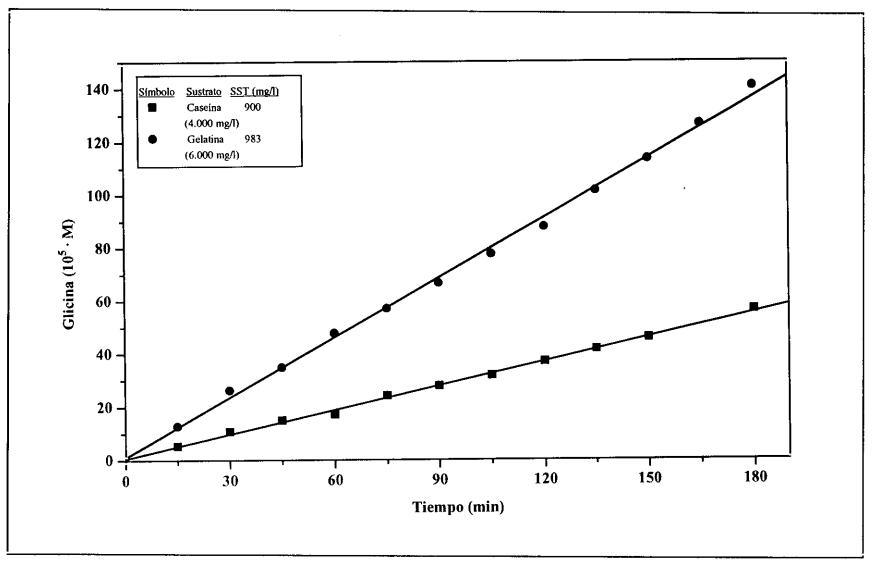


Figura 4.3. Comparación entre la velocidad de hidrólisis de caseína y gelatina en condiciones de saturación del lodo activado.

Tabla 4.1. Resultados de la regresión lineal de los datos cinéticos de hidrólisis de 4.000 mg/l de caseína por  $900 \pm 21$  mg SST/l de lodo activado de 10 días de edad.

Glicina (10 <sup>5</sup> M) = A + $V_{\text{max}} \cdot \text{Tiempo(min)}$						
Parámetro	Valor	ds	t <sub>.05,10</sub> · ds			
A	0,65	0,55	1,00			
V <sub>max</sub>	0,304	0,005	0,010			

R = 0.998, N = 11

DS=0,879

P=7.8E-13

 $V_{\text{max,e}} = V_{\text{max}}/\text{SST} = 0.203 \pm 0.011 \,\mu\text{mol Glicina/mg SST.h}$ 

Tabla 4.2. Resultados de la regresión lineal de los datos cinéticos de hidrólisis de 6.000 mg/l de caseína por  $983 \pm 19$  mg SST/l de lodo activado de 10 días de edad.

Glicina $(10^5 \text{ M}) = A + V_{\text{max}} \cdot \text{Tiempo (min)}$						
Parámetro	Valor	ds	t <sub>.05,11</sub> · ds			
A	1,04	1,42	2,55			
$V_{max}$	0,753	0,013	0,023			

R = 0.998, N = 12

SD = 2,304

P=5,1E-14

 $V_{\text{max},e} = V_{\text{max}}/\text{SST} = 0,459 \pm 0,023 \,\mu\text{mol Glicina/mg SST h}$ 

## IV.2. Influencia del pH y de la temperatura.

Con los resultados obtenidos en la fase experimental del estudio de la influencia del pH y de la temperatura sobre la actividad enzimática de los lodos activados (apartado III.6.2.) se han confeccionado las tablas 4.3. y 4.4., y las figuras 4.4. y 4.5. en las que se presentan las velocidades máximas específicas de hidrólisis de gelatina correspondientes a cada una de las condiciones del medio ensayadas.

En lo que se refiere al pH la curva de actividad, figura 4.4, expresada como V<sub>max,e</sub> frente al pH, presenta un perfil acampanado que demuestra que la actividad del enzima es máxima cuando el pH es de 7; por encima y por debajo de este valor se aprecia la disminución de la actividad enzimática de las proteasas del lodo activado. Mientras que pasar de pH 7 a 8,5, supone una reducción media de la V<sub>max,e</sub> del 16%, el pasar de 7 a 5,5 lo supone del 42%; es decir, el medio ácido inhibe en mayor medida que el medio básico la actividad enzimática de los lodos activados, lo que se corresponde con lo expuesto en la parte teórica de esta memoria sobre la incidencia del pH en los sistemas biológicos de depuración.

Por lo que respecta a la temperatura, el análisis de los resultados pone de manifiesto que la actividad enzimática aumenta al incrementarse la temperatura en todo el intervalo ensayado, triplicándose la actividad enzimática aproximadamente por cada 10°C de aumento de temperatura.

Puede afirmarse, en consecuencia, que el pH óptimo para la actividad enzimática de las proteasas bacterianas es 7; además, la velocidad máxima específica de la reacción de hidrólisis de la gelatina por el lodo activado aumenta al hacerlo la temperatura entre 10° y 35°C.

Interpretación y discusión de resultados

Tabla 4.3. Resultados experimentales del estudio del efecto del pH sobre la hidrólisis de 6.000 mg/l de gelatina por lodo activado de 10 días de edad.

EXP.	l .	iciones nentales	SST	V <sub>max</sub>	V <sub>max,e</sub>
	pН	T (°C)	(mg/l)	(105-mol Glicina/I-min)	(μmol Glicina/mg SST·h)
HG-1-1	5,5	!		0,288 ± 0,012	0,258 ± 0,019
HG-1-2	6,0			0,330 ± 0,021	0,296 ± 0,028
HG-1-3	7,0	25	670 ± 21	0,476 ± 0,021	0,426 ± 0,032
HG-1-4	8,0			0,409 ± 0,024	0,366 ± 0,033
HG-1-5	8,5	]			0,385 ± 0,052
HG-2-1	5,5			0,341 ± 0,020	0,253 ± 0,021
HG-2-2	6,0	_		0,462 ± 0,014	0,343 ± 0,019
HG-2-3	7,0	25	807 ± 19	0,613 ± 0,040	0,456 ± 0,040
HG-2-4	8,0	Ī		0,564 ± 0,027	0,419 ± 0,030
HG-2-5	8,5	Ţ		0,529 ± 0,035	$0.393 \pm 0.035$

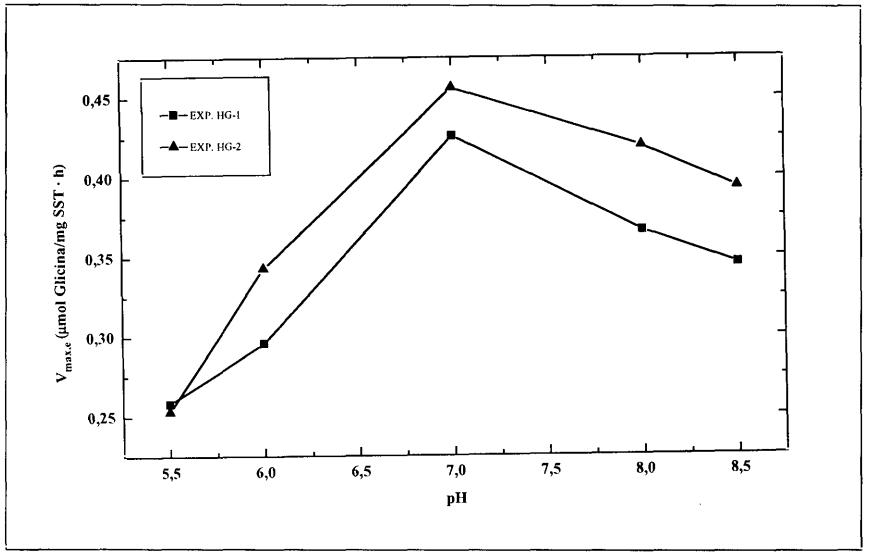


Figura 4.4. Influencia del pH en la actividad enzimática del lodo activado de 10 días de edad.

Interpretación y discusión de resultados

Tabla 4.4. Resultados experimentales del estudio del efecto de la temperatura sobre la hidrólisis de 6.000 mg/l de gelatina por lodo activado de 10 días de edad.

EXP.	Condiciones experimentales		SST	V <sub>max</sub>	V <sub>max,e</sub>	$\overline{V}_{ ext{max,e}}$						
	pН	T(°C)	(mg/l)	(105-mol Glicina/l-min)	(μmol Glicina/mg SST·h)							
HG-3-1				0,143 ± 0,013	0,124 ± 0,015							
HG-3-2	]	10		0,152 ± 0.020	0,132 ± 0,021	0,130						
HG-3-3	7,0		690 ± 19	0,155 ± 0,016	0,134 ± 0,018							
HG-3-4				0,952 ± 0,026	0,827 ± 0,046	<del></del> -						
HG-3-5		35		0,971 ± 0,037	0,844 ± 0,056	0,839						
HG-3-6				0,973 ± 0,075	0,846 ± 0,089	 						
HG-4-1				0,239 ± 0,018	0,205 ± 0,020							
HG-4-2		15		0,227 ± 0,023	0,194 ± 0,025	0,203						
HG-4-3	7,0								702 ± 17	0,247 ± 0,029	0,211 ± 0,030	
HG-4-4				0,692 ± 0,054	0,592 ± 0,060							
HG-4-5	ļ	30		0,655 ± 0,085	0,560 ± 0,086	0,578						
HG-4-6				0,682 ± 0,030	0,583 ± 0,040							
HG-5-1				0,419 ± 0,033	0,331 ± 0,035							
HG-5-2		20		0,448 ± 0,026	0,354 ± 0,029	0,343						
HG-5-3	7,0		759 ± 19	0,434 ± 0,052	0,343 ± 0,049							
HG-5-4		1		0,610 ± 0,038	0,482 ± 0,042							
HG-5-5	]	25		0,642 ± 0,078	0,508 ± 0,074	0,497						
HG-5-6				0,634 ± 0,040	0,501 ± 0,044							

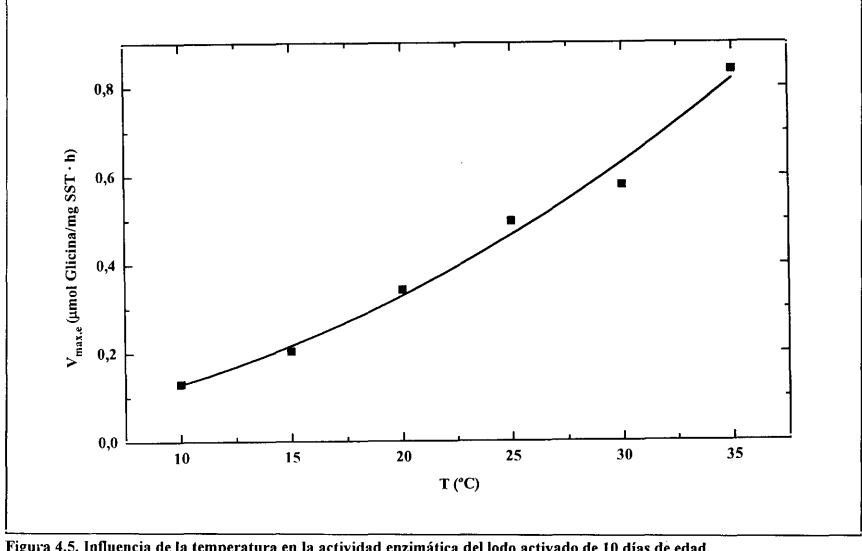


Figura 4.5. Influencia de la temperatura en la actividad enzimática del lodo activado de 10 días de edad.

## IV.3. Influencia de la edad del lodo.

Con los resultados experimentales obtenidos en el estudio de la influencia de la edad del lodo sobre su actividad enzimática, recogidos en el apartado III.6.3., se ha confeccionado la tabla resumen 4.5., en la que se presentan las velocidades máxima y máxima específica de hidrólisis de los ensayos realizados a pH 7 y temperatura de 25°C con lodos activados de 10 y 14 días de edad.

Para realizar la interpretación y discusión de estos resultados, se ha elaborado la tabla 4.6, en la que se recogen los valores medios de las velocidades máximas específicas de hidrólisis dentro de cada serie de ensayos, representativas de la actividad enzimática del lodo activado. Se advierte la existencia de una actividad enzimática diferente según sea la edad del lodo: con lodo de 10 días de edad la V<sub>max.e</sub> media se sitúa en 0,430 μmol Glicina/mg SST·h, mientras que con lodo de 14 días ésta alcanza los 0,714 μmol Glicina/mg SST·h.

Con el objetivo de confirmar esta situación se ha realizado el análisis de la varianza de los datos de la tabla 4.6, cuyos resultados se resumen en la tabla 4.7, y de cuyo análisis se deduce que, como la media de cuadrados entre los ensayos con lodo activado de edades diferentes (1,619·10<sup>-1</sup>) es mucho mayor que la media de cuadrados debida al error (7,19·10<sup>-4</sup>) es improbable que las medias de la V<sub>nuax.e</sub> de ambos lodos sean iguales. Más formalmente, es posible calcular el parámetro estadístico F de Snedecor (también conocido como de Fisher), según el cual

$$F_0 = \frac{1,618 \cdot 10^{-1}}{7,19 \cdot 10^{-1}} = 225,09$$

y compararlo con el valor tabulado al 95% del nivel de confianza para 1 y 6 grados de libertad respectivamente (Montgomery, 1991). Como  $F_{.05,1.6} = 5,99$  resulta que es mucho menor que el valor alcanzado por  $F_0$ , debe concluirse que las medias de tratamientos

difieren y, por tanto, la edad del lodo activado afecta significativamente su actividad enzimática.

Se explica que la actividad enzimática del lodo activado no permanezca constante al variar su edad por la relación entre microorganimos vivos y muertos en el sistema. El aumento de la proporción de microorganismos muertos, al crecer su edad, se debe a que la disminución en el caudal de purga de los lodos origina que la pérdida de materiales inertes y no reproductivos disminuya, produciéndose su acumulación en el sistema; estos materiales serían asimilados por los microorganismos vivos a través del metabolismo endógeno. Así, al estar constituida dicha materia por sustancias complejas que van a necesitar de una hidrólisis previa a su asimilación, la actividad de la enzimas que tomen parte en esta etapa se verá incrementada.

Interpretación y discusión de resultados

Tabla 4.5. Resultados experimentales de los ensayos de hidrólisis de 6.000 mg/l de gelatina por lodo activado de 10 y 14 días de edad.

	Condic	iones exper	rimentales SST		V <sub>max</sub>	V <sub>max,e</sub>	$\overline{V}_{\scriptscriptstylemax,e}$
EXP.	pН	T (°C)	θ <sub>c</sub> (días)	(mg/l)	(105-mol Glicina/1-min)	(µmol Glicina/mg SST·h)	
HG-6-1	İ				0,559 ± 0,063	0,431 ± 0,059	
HG-6-2	]		10	779 ± 19	0,539 ± 0,038	0,415 ± 0,039	0,419
HG-6-3	7	25			0,535 ± 0,023	0,412 ± 0,028	
HG-6-4		-			0,436 ± 0,027	0,717 ± 0,089	
HG-6-5			14	365 ± 22	0,446 ± 0,034	0,733 ± 0,102	0,722
HG-6-6	]		[		0,434 ± 0,025	0,715 ± 0,085	
HG-7-1					0,571 ± 0,021	0,435 ± 0,026	
HG-7-2			10	789 ± 19	0,581 ± 0,022	0,442 ± 0,027	0,436
HG-7-3	7	25			0,567 ± 0,055	0,431 ± 0,052	
HG-7-4	1				0,443 ± 0,021	0,680 ± 0,089	
HG-7-5			14	391 ± 32	0,447 ± 0,015	0,687 ± 0,079	0,678
 HG-7-6	1				0,435 ± 0,023	0,667 ± 0,090	

Interpretación y discusión de resultados 223

Tabla 4.5. Resultados experimentales de los ensayos de hidrólisis de 6.000 mg/l de gelatina por lodo activado de 10 y 14 días de edad (Continuación).

			Condiciones experimentales		Condiciones experimentales		V	V <sub>max,e</sub>	$\overline{V}_{ ext{max,e}}$
EXP.	рН	T (°C)	θ <sub>ε</sub> (dias)	SST (mg/l)	V <sub>max</sub> (10⁵·mol Glicina/l·min)	(μmol Glicina/mg SST·h)	* max,e		
HG-8-1	İ				0,422 ± 0,016	0,410 ± 0,029			
HG-8-2			10	618 ± 19	0,436 ± 0,026	0,423 ± 0,039	0,416		
HG-8-3	] 7	25			0,429 ± 0,033	0,416 ± 0,045			
HG-8-4	1 '			Ī	0,827 ± 0,074	0,748 ± 0,083			
HG-8-5	1		14	663 ± 14	0,840 ± 0,041	0,760 ± 0,053	0,759		
HG-8-6			1		0,849 ± 0,081	0,768 ± 0,090			
HG-9-1				<u> </u>	0,497 ± 0,023	0,453 ± 0,032			
HG-9-2			10	659 ± 16	0,502 ± 0,021	0,458 ± 0,031	0,447		
HG-9-3	7	25			0,474 ± 0,017	0,431 ± 0,026			
HG-9-4	1 ′	23		[	0,729 ± 0,028	0,717 ± 0,044			
HG-9-5	1	}	14	610 ± 13	0,702 ± 0,012	0,690 ± 0,027	0,697		
HG-9-6	1				0,697 ± 0,021	0,685 ± 0,036			

Tabla 4.6. Actividad enzimática del lodo activado de 10 y 14 días de edad expresada como  $V_{\text{max,e}}$  (µmol Glicina/mg SST·h).

	Edad del lodo, días		
	10	14	
	0,416	0,678	
	0,419	0,697	
	0,436	0,722	
	0,447	0,759	
Media	0,430	0,714	

Tabla 4.7. Análisis de varianza de los datos de la tabla 4.6.

Fuente de	Suma de	Grados de	Media de	F <sub>o</sub>
variación	cuadrados	libertad	cuadrados	
Edad del lodo	1,619·10-1	1	1,619·10-1	225,09
Error	4,315·10-3	6	7,190·10-4	
Total	1,662.10-1	7	2,374·10 <sup>-2</sup>	

## IV.4. Reproducibilidad de los experimentos.

La investigación con medios de cultivo mixtos, como son los lodos activados, sujetos a variaciones significativas en la composición de sus especies y actividad, según sean las condiciones del medio, hace que los resultados obtenidos en momentos diferentes puedan no coincidir plenamente y, sin embargo, tener validez desde un punto de vista estadístico. Así, parece oportuno demostrar la reproducibilidad del procedimiento de operación, antes del estudio de la influencia de factores externos al medio sobre la actividad de los lodos activados.

Para ello se han utilizado los resultados experimentales obtenidos en el anterior punto de la memoria, evaluando la precisión del método para la medida de la actividad del lodo activado mediante los coeficientes de variación (CV) dentro de cada serie de ensayos, para cada uno de los dos tipos de lodos. Los resultados obtenidos se recogen en las tablas 4.8 y 4.9.

El análisis de los coeficientes de variación pone de manifiesto la excelente precisión del método cuando se realizan ensayos utilizando alícuotas de lodo activado procedentes de un mismo volumen de purga del tanque de aeración de la planta piloto, habida cuenta que el valor más dispar es de un 3,2%. Sin embargo, el método pierde fiabilidad cuando se comparan los valores medios de los resultados obtenidos con lodos procedentes de distintas purgas, situación que se observa con mayor claridad si se realiza un análisis de la varianza que conduce a los resultados que se recogen en las tablas 4.10. y 4.11.

Si se compara el valor  $F_0$  obtenido en el caso del lodo de 10 días de edad con el valor tabulado de la F de Snedecor al 95% del nivel de confianza para 3 y 8 grados de libertad respectivamente, se observa que  $F_0 = 6,63$  es mayor que  $F_{.05,3,8} = 4,07$ , lo que indica la existencia de diferencias significativas entre las medias de cada serie de ensayos con los valores obtenidos dentro de ellas para el nivel de confianza elegido. Esta diferencia

es cuantitativamente más significativa en el caso de los ensayos con lodo activado de 14 días de edad para los que el valor de  $F_0$  asciende a 24,26.

Dado que la forma de operación es la misma en todos los ensayos que corresponden al trabajo presentado en esta memoria es lógico suponer que la menor reproducibilidad del método se debe a la propia variabilidad del sistema objeto de estudio cuando se utilizan lodos activados procedentes de distintas purgas. Por ello, en la última etapa de esta investigación se realizan ensayos comparativos utilizando alícuotas de lodo procedentes de una misma purga del tanque de aeración, para minimizar el error debido al medio de cultivo mixto con el que se trabaja.

Tabla 4.8. Actividad enzimática del lodo activado de 10 días de edad expresada como  $V_{\rm max,e}$  (µmol Glicina/mg SST·h).

	Experimento				
	HG-6	HG-7	HG-8	HG-9	
	0,431	0,435	0,410	0,453	
	0,415	0,442	0,423	0,458	
	0,412	0,431	0,416	0,431	
Media	0,419	0,436	0,416	0,447	
DS	0,0102	0,0056	0,0065	0,0144	
CV <sup>(*)</sup>	2,4	1,3	1,6	3,2	

Tabla 4.9. Actividad enzimática del lodo activado de 14 días de edad expresada como  $V_{\rm max,e}$  (µmol Glicina/mg SST·h).

	Experimento				
	HG-6	HG-7	HG-8	HG-9	
	0,717	0,680	0,748	0,717	
	0,733	0,687	0,760	0,690	
	0,715	0,667	0,768	0,685	
Media	0,722	0,678	0,759	0,697	
DS	0,0099	0,0101	0,0101	0,0172	
CV <sup>(*)</sup>	1,4	1,5	1,3	2,5	

<sup>(\*)</sup> CV = (DS/Media)\*100

Tabla 4.10. Análisis de varianza de los datos de la tabla 4.8.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F <sub>0</sub>
Entre experimentos	1,910·10 <sup>-3</sup>	3	6,370·10 <sup>-4</sup>	6,63
Dentro de los experimentos	7,680·10-4	8	9,600·10 <sup>-5</sup>	
Total	2,678.10 <sup>-3</sup>	11	2,430·10-4	

Tabla 4.11. Análisis de varianza de los datos de la tabla 4.9.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F <sub>o</sub>
Entre experimentos	1,008·10 <sup>-3</sup>	3	3,626·10 <sup>-3</sup>	24,26
Dentro de los	1,19610 <sup>-3</sup>	8	1,500·10 <sup>-4</sup>	
Total	1,208.10-2	11	1,098·10 <sup>-3</sup>	

## IV.5. Influencia de los iones metálicos Cu(II) y Zn(II).

La última etapa de este trabajo de investigación corresponde al estudio de la influencia de factores externos al medio sobre la actividad enzimática de los lodos activados, como son los iones metálicos Cu(II) y Zn(II).

Los resultados presentados en el apartado III.6.4, se resumen en la tabla 4.12 y en la figura 4.6, para el ión Cu(II); y, en la tabla 4.13 y en la figura 4.7, para el ión Zn(II).

En la figura 4.6 se observa el efecto del cobre sobre la actividad enzimática del lodo para los tres niveles de pH ensayados. Destaca que cuando el pH del medio es 8 no se aprecia efecto alguno sobre la actividad enzimática del lodo, los valores de la velocidad máxima específica de hidrólisis se encuentran siempre dentro del intervalo de confianza del ensayo de control. Sin embargo, para los otros dos niveles de pH el efecto negativo es significativo y sigue, en general, la misma tendencia: concentraciones bajas del ión metálico, 1 mg/l, no modifican significativamente la actividad enzimática del lodo, mientras que concentraciones desde 5 hasta 20 mg/l reducen la velocidad máxima específica de hidrólisis tanto más cuanto mayor es la concentración; después, se estabiliza el efecto.

Por lo que se refiere al zinc, en la figura 4.7 se observa un comportamiento cualitativo similar al del cobre. En este caso, tampoco a pH 8 se advierte efecto negativo, pero a pHs 6 y 7 se aprecia la influencia negativa de este ión metálico sobre la actividad enzimática del lodo.

El estudio comparado de las figuras 4.6 y 4.7 muestra la reducción cuantitativa similar de la actividad enzimática provocada por ambos iones a pHs 6 y 8; sin embargo, a pH 7 se comprueba que el efecto negativo originado por el ión Cu(II) es más acusado que el ocasionado por el ión Zn(II).

Al objeto de estudiar los posibles efectos sinérgicos entre ambos iones metálicos, se realizaron los ensayos con mezclas de ambos metales cuyos resultados se encuentran recogidos en la tabla 4.14 y en la figura 4.8.

Se aprecia un comportamiento cualitativo similar al observado en el tratamiento individual de los metales. A pH 7 se observa una ligera disminución de la actividad del lodo con las mezclas de metales en las que las concentraciónes de Cu(II) son más elevadas; así pues, se confirma que el Cu(II) presenta mayor toxicidad que el Zn(II). También, la reducción de la actividad enzimática del lodo es cuantitativamente semejante a la observada en el tratamiento individual para todas las concentraciónes ensayadas, no apreciandose ningún efecto sinérgico.

Por último, para determinar el efecto de la edad del lodo sobre la inhibición enzimática se realizaron experimentos con lodos de 10 y 14 días de edad, en presencia de concentraciones de 20 mg/l de Cu(II) o de Zn(II). Los resultados correspondientes se presentan en la tabla 4.15 y en la figura 4.9.

Del análisis de estos resultados se concluye que la inhibición enzimática producida por el ión Cu(II) es cuantitativamente más importante que la producida por el Zn(II), tanto si se utiliza lodo activado de 10 días de edad como si se trabaja con lodo de 14 días. Así, la reducción de la actividad enzimática es de un 30% en el caso del ión Cu(II) y de un 20% en el del ión Zn(II). Se observa, también, como la reducción en términos absolutos de la actividad enzimática del lodo activado de 14 días es más acusada que la del lodo de 10 días.

La estabilización del efecto negativo del Cu(II) y del Zn(II) a pH 8 así como al aumentar su concentración en los otros niveles de pH ensayados se explica por su precipitación en forma de hidróxidos y/o fosfatos al sobrepasarse su solubilidad en dichas condiciones experimentales.

Interpretación y discusión de resultados

Tabla 4.12. Resultados experimentales de los ensayos de hidrólisis de 6.000 mg/l de gelatina por lodo activado de 10 días de edad en presencia del ión metálico Cu(II).

EAD	Condiciones experimen		erimentales	COT	17	, v	
EXP.	рН	T (°C)	[Cu <sup>2+</sup> ] (mg/l)	SST (mg/l)	V <sub>max</sub> (10 <sup>5</sup> ·mol Glicina/l·min)	V <sub>max,e</sub> (μmol Glicina/mg SST·h)	
HG-10-1		25	0	963 ± 22	0,619 ± 0,085	0,385 ± 0,062	
HG-10-2			1		0,674 ± 0,020	0,403 ± 0,022	
HG-10-3	6		5		0,563 ± 0,024	0,350 ± 0,023	
HG-10-4			10		0,530 ± 0,019	0,330 ± 0,019	
HG-10-5			20		0,463 ± 0,030	0,288 ± 0,025	
HG-10-6			40		0,457 ± 0,037	0,285 ± 0,030	
HG-H-1		25	0	939 ± 20	0,767 ± 0,016	0,490 ± 0,021	
HG-11-2	7		1		0,740 ± 0,044	0,473 ± 0,038	
HG-11-3			5		0,706 ± 0,047	0,451 ± 0,040	
HG-11-4			10		0,611 ± 0,023	0,390 ± 0,023	
HG-11-5			20		0,520 ± 0,027	0,333 ± 0,024	
HG-11-6			40		0,506 ± 0,043	0,324 ± 0,035	
HG-12-1			0	694 ± 15	0,482 ± 0,041	0,416 ± 0,044	
HG-12-2	8		1		0,477 ± 0,050	0,412 ± 0,052	
HG-12-3		25	5		0,490 ± 0,037	0,424 ± 0,041	
HG-12-4			10		0,471 ± 0,042	0,407 ± 0,045	
HG-12-5			20		0,465 ± 0,036	0,402 ± 0,040	
HG-12-6			40		0,499 ± 0,031	0,431 ± 0,036	

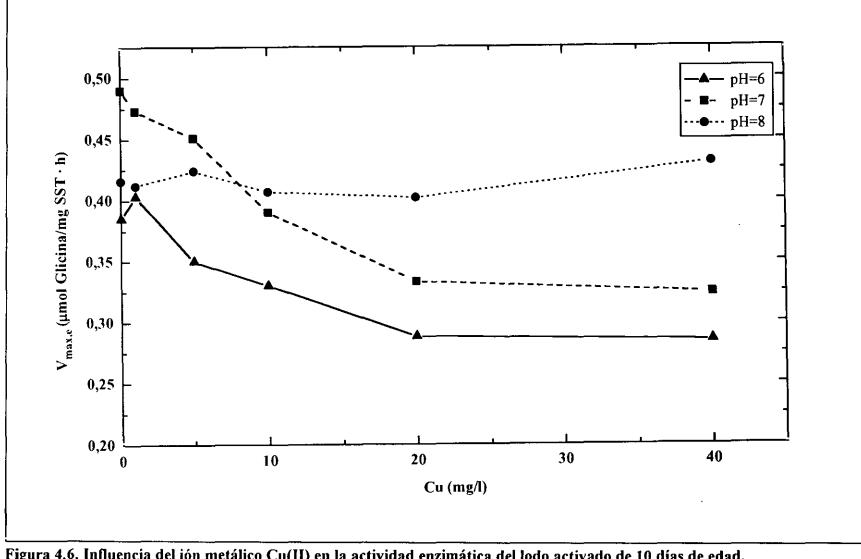


Figura 4.6. Influencia del ión metálico Cu(II) en la actividad enzimática del lodo activado de 10 días de edad.

Interpretación y discusión de resultados 233

Tabla 4.13. Resultados experimentales de los ensayos de hidrólisis de 6.000 mg/l de gelatina por lodo activado de 10 días de edad en presencia del ión metálico Zn(II).

EMB	Condiciones experimentales		COT				
EXP.	рН	T (°C)	[Zn²+] (mg/l)	SST (mg/l)	V <sub>max</sub> (10⁵·mol Glicina/l·min)	V <sub>max,e</sub> (μmol Glicina/mg SST·h)	
HG-13-1	G-13-2 G-13-3	25	0	935 ± 20	0,554 ± 0,028	0,355 ± 0,026	
HG-13-2			1		0,557 ± 0,030	0,357 ± 0,027	
HG-13-3			5		0,536 ± 0,038	0,344 ± 0,032	
HG-13-4			10		0,494 ± 0,054	0,317 ± 0,042	
HG-13-5			20		0,457 ± 0,055	0,293 ± 0,042	
HG-13-6			40		0,404 ± 0,042	0,259 ± 0,033	
HG-14-1		<u>.</u>	0	955 ± 20	0,725 ± 0,022	0,456 ± 0,024	
HG-14-2	7		1		0,730 ± 0,027	0,459 ± 0,027	
HG-14-3		25	5		0,692 ± 0,025	0,435 ± 0,025	
HG-14-4			10		0,589 ± 0,068	0,370 ± 0,051	
HG-14-5			20		0,564 ± 0,063	0,355 ± 0,047	
HG-14-6			40		0,567 ± 0,044	0,357 ± 0,035	
HG-15-1			0	862 ± 20	0,602 ± 0,058	0,419 ± 0,050	
HG-15-2	8		1		0,636 ± 0,055	0,442 ± 0,048	
HG-15-3		25	5		0,615 ± 0,054	0,428 ± 0,047	
HG-15-4			10		0,620 ± 0,016	0,432 ± 0,021	
HG-15-5			20		0,584 ± 0,063	0,407 ± 0,053	
HG-15-6			40		0,608 ± 0,034	0,424 ± 0,033	

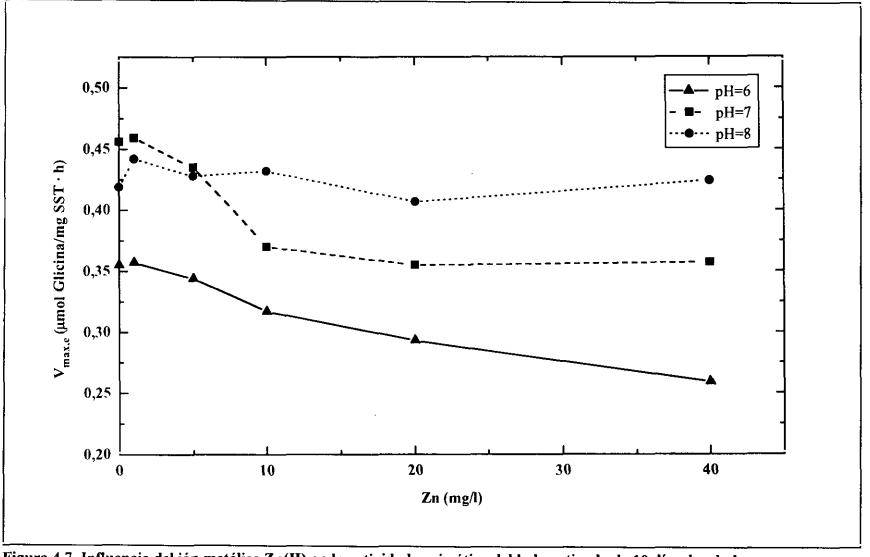


Figura 4.7. Influencia del ión metálico Zn(II) en la actividad enzimática del lodo activado de 10 días de edad.

Interpretación y discusión de resultados

Tabla 4.14. Resultados experimentales de los ensayos de hidrólisis de 6.000 mg/l de gelatina por lodo activado de 10 días de edad en presencia de mezclas de los iones metálicos Cu(II) y Zn(II).

		Condicio	ones experimenta	ıles	COT										
EXP.	рН	T (°C)	[Cu <sup>2+</sup> ] (mg/l)	[Zn²+] (mg/l)	SST (mg/l)	V <sub>max</sub> (10 <sup>5</sup> -mol Glicina/I-min)	V <sub>max,e</sub> (μmol Glicina/mg SST·h)								
HG-16-1		25	0	0	1024 ± 21	.0,632 ± 0,022	0,371 ± 0,021								
HG-16-2			40	1		0,504 ± 0,034	0,295 ± 0,026								
HG-16-3	6		20	5		0,510 ± 0,032	0,299 ± 0,025								
HG-16-4			10	10		0,492 ± 0,024	0288 ± 0,020								
HG-16-5			5	20		0,521 ± 0,041	0,305 ± 0,031								
HG-16-6	]		1	40		0,530 ± 0,026	0,310 ± 0,022								
HG-17-1		25	0	0		0,724 ± 0,018	0,454 ± 0,021								
HG-17-2			40	1	956 ± 20	0,559 ± 0,046	0,351 ± 0,036								
HG-17-3	7		20	5		0,578 ± 0,039	0,363 ± 0,032								
HG-17-4											10	10		0,588 ± 0,031	0,369 ± 0,027
HG-17-5					5	20		0,627 ± 0,022	0,393 ± 0,022						
HG-17-6			1	40		0,606 ± 0,048	0,380 ± 0,038								
HG-18-1		8 25	0	0		0,648 ± 0,026	0,392 ± 0,024								
HG-18-2	8		40	1		0,623 ± 0,018	0,376 ± 0,019								
HG-18-3			20	5	993 ± 21	0,641 ± 0,016	0,388 ± 0,018								
HG-18-4			10	10		0,652 ± 0,030	0,394 ± 0,026								
HG-18-5			5	20		0,627 ± 0,054	0,379 ± 0,041								
HG-18-6			1	40		0,631 ± 0,030	0,382 ± 0,026								

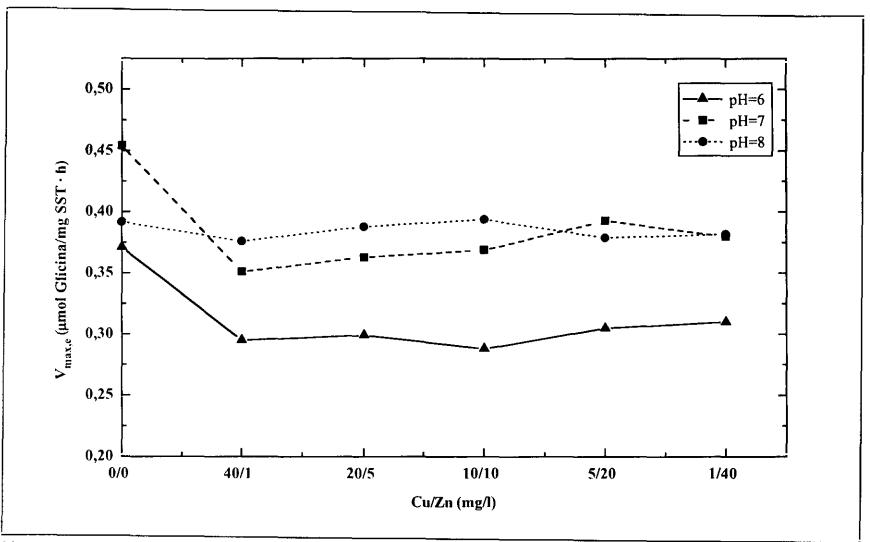


Figura 4.8. Influencia de las mezclas de los iones metálicos Cu(II) y Zn(II) en la actividad enzimática del lodo activado de 10 días de edad.

Interpretación y discusión de resultados 237

Tabla 4.15. Resultados experimentales del estudio comparativo de la inhibición causada por los iones metálicos Cu(II) y el Zn(II) sobre la hidrólisis de 6.000 mg/l de gelatina por lodo activado de 10 y 14 días de edad.

EXP. pl		Condici	ones exper	imentales		SST (mg/l)	V <sub>max</sub> (10 <sup>s</sup> -mol Glicina/I-min)	V <sub>max,e</sub> (μmol Glicina/mg SST·h)
	рЫ	T (°C)	θ <sub>c</sub> (días)	[Cu²+] (mg/l)	[Zn²+] (mg/l)			
HG-19-1		Ī		0	0		0,515 ± 0,020	0,445 ± 0,030
HG-19-2		25	10	20	0	695 ± 19	0,364 ± 0,014	0,315 ± 0,021
HG-19-3	7			0	20		0,432 ± 0,021	0,373 ± 0,028
HG-19-4				0	0		0,711 ± 0,025	0,656 ± 0,037
HG-19-5			14	20	0	651 ± 14	0,501 ± 0,027	0,462 ± 0,035
HG-19-6	]			0	20	Ī	$0,547 \pm 0,051$	0,505 ± 0,058
HG-20-1				0	0		0,471 ± 0,013	0,428 ± 0,025
HG-20-2		25	10	20	0	661 ± 20	0,322 ± 0,024	0,292 ± 0,031
HG-20-3	7			0	20		0,368 ± 0,006	0,334 ± 0,015
HG-20-4	]			0	0		0,677 ± 0,030	0,665 ± 0,069
HG-20-5			14	20	0	610 ± 13	0,477 ± 0,038	0,469 ± 0,048
HG-20-6	]			0	20		0,552 ± 0,065	0,542 ± 0,076

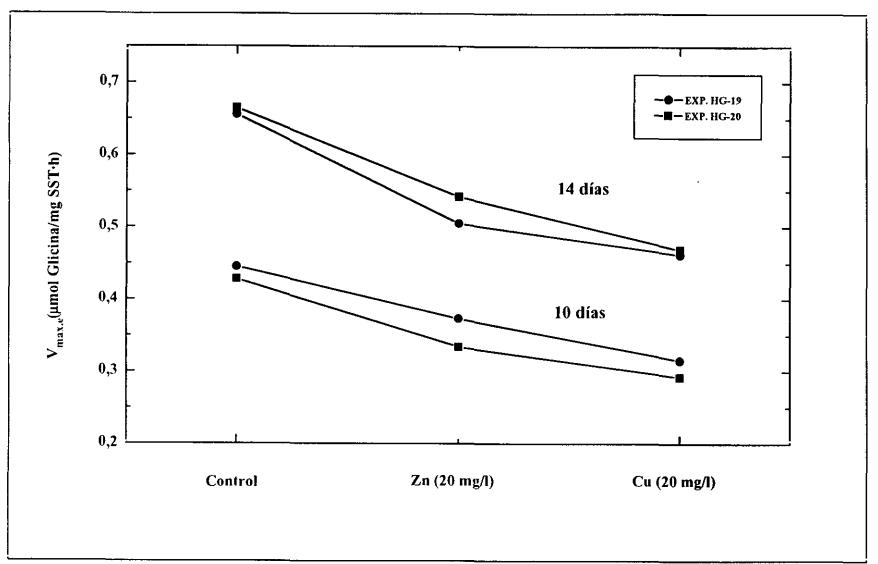


Figura 4.9. Influencia de la edad del lodo en la inhibición enzimática originada por el Cu(II) y el Zn(II).

Con los resultados experimentales obtenidos en este trabajo de investigación, en el que se propone determinar el grado de actividad de los sistemas de depuración biológicos siguiendo la reacción de hidrólisis enzimática de una proteína de origen natural, se deducen las siguientes conclusiones:

- 1.- Queda plenamente demostrada que la determinación de la actividad de las proteasas bacterianas puede ser utilizada como medida de la actividad del lodo activado, por la excelente reproducibilidad del método cuando se utiliza como sustrato gelatina en concentración de 6.000 mg/l para concentraciones de biomasa iguales o inferiores a 1 g SST/l, operando a pH 7 y temperatura de 25°C.
- 2.- La reproducibilidad del método para la determinación de la actividad enzimática es elevada: El valor máximo del coeficiente de variación ha sido del 3,2%. La precisión es mayor cuando se comparan resultados correspondientes a determinaciones realizadas con muestras de lodo procedentes de la misma purga, para evitar la variabilidad del complejo cultivo bacteriano con el que se trabaja.
- 3.- La edad del lodo afecta a la actividad hidrolítica de las proteasas. Los lodos de más edad presentan mayor actividad enzimática como consecuencia de la asimilación endógena del protoplasma celular de los microorganismos muertos.
- 4.- En el intervalo de temperaturas experimentado, 10° a 35°C, las velocidades de hidrólisis se triplican cada 10°C.
- 5.- Se ha comprobado que la presencia del Cu(II) y el Zn(II) inhiben parcialmente la actividad enzimática de los microorganismos. Son los iones metálicos solubles los que provocan el efecto negativo sobre los microorganismos y no sus compuestos insolubles.

La inhibición enzimática porcentual producida sobre el lodo activado por ambos iones metálicos es independiente de la edad del lodo, siendo más importante el efecto negativo ocasionado por el Cu(II) que el del Zn(II).

Adler-Nissen, J. (1979). Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolyzates by trinitrobenzenesulfonic acid. J. Agric. Food Chem. 27, 1256.

Agardy F. J., Cole R. D. and Pearson E. A. (1963). Kinetic and Activity Parameters of Anaerobic Fermentation Systems. SERL Report No. 63-2. Berkeley: Sanitary Engineering Research Laboratory, University of California.

Andern, E. and Lockett W.T. (1914). Experiments on the oxidation of sewage without the aid of filters. J. Soc. Chem. Ind. 33, 523.

Anderson K., Koopman B. and Bitton G. (1988). Evaluation of INT- deshidrogenase assay for heavy metal inhibition of activated sludge. *Wat. Res.* 22, 3, 349.

Bitton, G. and Koopman, B. (1982). Tetrazolium reduction-malachite green method for assessing the viability of filamentous bacteria in activated sludge. *Appl. Envir. Mocrobiol.* 43, 964.

Boczar, B. A., Begley W. M. and Larson, R. J. (1992). Characterization of enzyme activity in activated sludge using rapid analyses for specific hydrolases. *Water Environ. Res.*, 64, 792.

Brezonik P. and Patterson J. W. (1971). Activated sludge ATP: effects of environmental stress. J. sanit. Engng Div. Proc. Am. Soc. civ. Engrs. 97, 813.

Bucksteeg, W. (1966). Determination of sludge activity: A possibility of controlling activated sludge plants. *Proc. 3rd International Conference on Water Pollution Research, Munich*.

Bucksteeg, W. and Thiele, H. (1959). Die Beurteilung von Abwasser und Schlamm mittels TTC. Gass-und Wasserfach, (Ger.) 100, 916.

Burger, W. C. (1974). Interference by carbonyl compounds in the trinitrobenzenesulnic acid method for amino groups. *Anal. Biochem.* 57, 306.

Carlson D.A. (1965). Utilization of Free and Combined Amino Acids by Activated Sludge. Ph. D. Thesis. University of Washington, College of Engineering.

Cenci G. and Morozzi G. (1979). The validity of the TTC-test for dehydrogenase activity of activated sludges in the presence of chemical inhibitors. Zentbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. B. 169, 320-330.

Chandra, S et al. (1987). Evaluation of oxygen uptake rate as an activated sludge process control parameter. J. Water Pollut. Control Fed. 59, 1009.

Chiu, S.Y., Kao, I.C., Erickson, L.E., and Fan, L.T. (1973). ATP pools in activated sludge. J. Wat. Pollut. Control Fed., 45, (8), 1746.

DeSha C.M. and Dozier B.J. (1979). A direct counting method for assessing the performance of denitrification bioreactors. *Devs. ind. Microbiol.* 20, 617.

Dutka B. J., Nyholm N. and Peterson J. (1983). Comparison of several microbiological toxicity screening tests. *Wat. Res.* 17, 1363.

Eadie, G.S. (1942). The inhibition of cholinesterase by physostigmine and prostigmine. J. Biol. Chem., 146, 85.

Eckenfelder, W. W. (1980). Principles of water quality management. CBl Publishing Company, Inc. Boston, Massachusetts.

Federle. T. W., Dobbins, D. C., Thornton-Manning, J. R. and Jones, D. D. (1986). Microbial biomass, activity, and community structure in subsurface soils. *Grnd. Wat.* 24, 356.

Felix, A.M., Toome V., De Bernardo S., and Weigele, M. (1975). Colorimetric Amino Acid Analysis Using Fluorescamine. *Arch. Biochem. Biophys.* 168, 601.

Ford D. L., Echenfelder W. W. and Yang T. (1966). Dehydrogenase enzyme as a parameter of activated sludge activities. *Proc. 21st Industrial Waste Conference, Purdue University.*, 538.

García Alvarez-Coque, M.C., Medina Hernández, M.J., Villanueva Camañas R.M., and Mongay Fernández C. (1989). Formation and instability of o-phtalaldehydo derivatives of amino acids. *Anal. Biochem.* 178:1.

Gaudy A. F. (1963). Colorimetric determination of protein and carbohydrate. *Ind. Water Wastes 7, 17.* 

Genetelli E.J. (1967). DNA and Nitrogen Relationships in Bulking Activated Sludge. J. Water Pollut. Control Fed. 39, Part 2, R 32.

Gikas, P. and Livingston, A.G. (1993). Use of ATP to characterize biomass viability in freely suspended and immobilized cell bioreactors. *Biotechnol. Bioeng.*, 42, 1337.

Halász, V. A. (1972). Zusammenhang zwischen Dehydrogenaseaktivität und Eachstumsrate des Belebtschlammes. *Hydrologie*, 34, 1, 94.

Hamilton R. D. and Holm-Hansen O. (1967). Adenosine Triphosphate content of marine bacteria. *Limmol. Oceanogr.* 12, 319.

Hartmann L. and Laubenberger G. (1968). Toxicity measurements in activated sludge. J. Sanit. Engng Div., Proc. ASCE, 94 (SA2), 247.

Hernández Muñoz, A. (1994). Depuración de aguas residuales. Servicio de publicaciones de la Escuela de Ingenieros de Madrid (U.P.M.).

Higgins, I. J. and Burns, R. G. (1975). The chemistry and microbiology of pollution. Academic, London.

Holm-Hansen O. and Booth C. R. (1966). The measurement of adenosine triphosphate in the ocean and its ecological significance. *Limnol. Oceanogr.* 11, 510.

Hoover, S. R. and Porges, N. (1952). Assimilation of dairy wastes by activated sludge, II: The equation of synthesis and oxygen utilization. Sewage Ind. Wastes, 24.

Huang, J.Y.C. and Cheng, M. D. (1984). Measurement and new applications of oxygen uptake rates in activated sludge processes. J. Water Pollut. Control Fed., 56, 259.

Huang, J.Y.C. et al. (1985). Oxygen uptake rates for determining microbial activity and aplication. *Water Res.*. 19, 373.

Hunter J. V. and Heukelekian H. (1965). The composition of domestic sewage fractions. J. Wat. Pollut. Control Fed. 37, 1142.

Jacobsen, C.F. and Léonis, J.(1951). A recording auto-titrator. C.R. Trav. Lab. Carlsberg, sér. chim. 27, 333.

Jacobsen, C.F., Léonis, J., Linderstrøm-Lang, K. and Ottesen, M.(1957). The pH-Stat and its use en biochemistry. *Meth. Biochem. Anal. 4, 171.* 

Jones, Ph. H. and Prasad, D. (1969). The use of tetrazolium-salts as a measure of sludge activity. J. Wat. Pollut. Control Fed. 41, R441.

Jørgensen, K. P. (1984). Determination of the Enzyme Activity of Activated Sludge by Methylene Blue Reduction. J. Water Pollut. Control Fed., 56, 1, 89.

Jørgensen, P. E., Eriksen, T. and Jensen, B. K. (1992-a). Estimation of viable biomass in wastewater and activated sludge by determination of ATP, oxigen utilization rate and FDA hydrolisis. *Water Res.* 26, 11, 1495.

Jørgensen, P. E., Eriksen, T. and Jensen, B. K. (1992-b). Changes in growth culture FDA activity under changing growth conditions. *Water Res.* 26, 9, 1267.

Katayama K. (1984). Inhibition by copper ion of the activity of β-galactosidase and deshydrogenases of activated sludge. *Japan J. Wat. Pollut. Res.* 7, 100.

Katayama K. (1986). Inhibition of the activities of  $\beta$ -galactosidase and dehydrogenases of activated sludge by heavy metals. *Wat. Res.* 20, 4, 491.

Kees, U., Lewenstein, A., and Bachofen, R. (1975). ATP pools in activated sludge. European J. Appl. Microbiol., 2, (1), 59.

Khararjian, H.A. (1980). Oxygen uptake as a control parameter. J. Water Pollut. Control Fed. 52, (4), 823.

Kim, C.-W., Koopman, B. and Bitton, G. (1987). Effect of suspend solids concentration and filament type on the toxicity of chlorine and hydrogen peroxide to bulking activated sludge. *Toxic. Assess. 2, 49-62.* 

Kim, C.-W., Koopman, B. and Bitton, G. (1994). INT-Dehydrogenase activity test for assessing chlorine and hidrogen peroxide inhibition of filamentous pure cultures and activated sludge. *Water Res.* 28. 5. 1117-1121.

Klapwijk, A., Drent J. and Shenvoorden J.H.A.M. (1974) A modified procedure for the TTC-Dehydrogenase Test in Activated Sludge. *Water Res.*, 8, 121.

Lenhard G., Nourse L. D. and Swartz H. M. (1964). The measurement of dehydrogenase activity of activated sludges. *Proc. 2nd International Conference on Water Pollution Research*, Tokyo.

Levine A. D. (1991). Size distribution of particulate contaminants in wastewater and their impact on treatability. Wat. Res. 25, 911.

Lineweaver, H. and Burk, D. (1934). The determination of enzyme dissociation constants. J. Am. Chem. Soc., 56, 658.

Logue C., Koopman B. and Bitton G. (1983). INT-reduction assays and control of sludge bulking. J. Envir. Engng. 109, 915-923.

Lora Soria, F y Miro Chavarria, J. (1978). Técnicas de defensa del medio ambiente. Ed. Labor S.A. Barcelona.

Madden, M. and Tittlebaum, M. (1984). Oxygen uptake rates associated with biological treatment of pentachlorophenol wastewater. J. Environm. Sci. Health, A19, 321.

Medina Hernández M. J., Bonet Domingo E., Villanueva Camañas, R. M., and García Alvarez-Coque M.C. (1991). Use of o-Phthalaldehyde and N-Acetyl-L-Cysteine Reagent in the Evaluation of Milk Proteins. *J. Dairy Sci.* 74:1779.

Metcalf and Eddy, Inc. (1985). Ingeniería Sanitaria. Tratamiento, evacuación y reutilización de aguas residuales. Ed. Labor, S.A. Barcelona.

Metzler, D.E. (1981). Bioquímica: Las reacciones químicas en las células vivas. Ed. Omega, S.A. Barcelona.

Michaelis, L. and Menten, M.L. (1913). Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochem. Z.*, 49, 333.

Mihalyi, E. (1972). Application of proteolytic enzymes to protein structure estudies. CRC Press.

Mokrasch, L.C. (1967). Use of 2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic acid for the coestimation of amines, amino acids, and proteins in mixtures. *Anal. Biochem.* 18, 64.

Montgomery, D.C. (1991). Diseño y análisis de experimentos. Grupo Editorial Iberoamérica. México.

Moore, S., Stein, W.H. (1948), Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids. J. Biol. Chem. 176, 367.

Neethling, J. B. (1985). Using ATP to determine the chlorine resistance of filamentous bacteria associated with activated sludge bacteria. J. Water Pollut. Control Fed., 57, 890.

Nybroe N., Jørgensen P. E. and Henze M. (1992). Enzyme activities in wastewater and activated sludge. *Wat. Res.* 26, 5, 579.

Patterson J. W., Brezonik P. L. and Putnam H. D. (1969). Sludge activity parameters and their application to toxicity measurements in activated sludge. *Proc. 24th Indust. Waste Conf.*, *Purdue Univ.*, 127.

Richards S. R., Hastwell C. and Davies M. (1984). The comparative examination of 14 activated -sludge plants using enzymatic techniques. *Wat. Pollut. Control* 83, 175.

Rickert D. A. and Hunter J. V. (1967). Rapid fractionation and material balance of solid fractions in wastewater efluent. J. Wat. Pollut. Control Fed. 29, 1475.

Roe, P.C., and Bhagat, S.K. (1982). ATP as a control parameter for activated-sludge processes. J. Wat. Pollut. Control Fed. 54, (3), 244.

Rodier, J. (1989). Análisis de las aguas. Ed. Omega. Barcelona.

Ronzano, E. y Dapena, J.L.(1995). Tratamiento biológico de las aguas residuales. Ed. Diaz de Santos, S.A. Madrid.

Rupley, J.A. (1967). Susceptibility to attack by proteolytic enzymes. *Meth. Enzymol.* 11, 905.

Ryssov-Nielsen, H. (1975). Measurement of Inhitibition of Respiration in Activated Sludge by a Modified Determination of the TTC-Dehydrogenase Activity. *Water Res. 9*, 1179.

Satake, K., Okuyama, T., Ohashi, M., and Shinoda, T. (1960). J. Biochem. 47, 654.

Schnürer, J. and Roswall, T. (1982). Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter. *Appl. envir. Microbiol.* 43, 1256.

Schnürer, J., Clarholm, M. and Rosswall, T. (1985). Microbial biomass and activity in agricultural soil with different organic matter contents. *Soil Biol. Biochem.* 17, 611.

Snyder S. L. and Sobocinski P. Z. (1975). An improved 2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic acid method for the determination of amines. *Anal. Biochem.* 64, 284.

Spanjers, H. and Klapwik, A. Continuous estimation of short term oxygen demand from respiration measurements. *Water Sci. Technol.*. 24, 29.

Spanjers, H. and Olsson, G. (1992). Modeling of the dissolved oxygen probe response in the improvement of the performance of a continuous respiration meter. *Water Res.* 26, 945.

Stafford, D. A. and Calley, A.G. (1977). Treatment of Industrial Effluents. Eds. Callely, A.G., Forster, G.F. and Stafford, D.A., Hodder and Sotughton, Londres.

Stanier R. Y., Doudoroff M. and Adelberg E. A. (1963). The microbial World. *Prentice-Hall, New Jersey*.

Stanier, R.Y, Adelberg, E.A. and Ingahan, J.L.(1986). Microbiología. Ed. Reverte. Barcelona.

Steinhardt, J. and Beychok, S. (1964). Interactions of proteins with hidrogen ions and other small ions and molecules. In: The proteins (Neurath, H., ed.), Academic Press, New York. Vol. II, pp. 139.

Suschka, J. and Ferreira, E. (1986). Activated sludge respirometric measurements. Water Res. 20, 137.

Swisher, R. and Carroll, G. C. (1980). Fluorescein diacetate hydrolysis as an estimator of microbial biomass on coniferous needle surfaces. *Microb. Ecol.* 6, 217.

Symons J. M. and McKinney R. E. (1958). The biochemistry of nitrogen in the synthesis of activated sludge. Sewage Ind. Wastes 30, 874.

Taber, W.A. (1976). Wastewater Microbiology. Ann. Rev. Microbiol. 30, 263.

Teuber M. and Brodisch K. F. U. (1976). Enzymatic activities of activated sludge as potencial measures of active biomass. *Proc. Soc. Gen. Microbiol.*, 3, 119.

Teuber M. and Brodisch K. F. U. (1977). Enzymatic activities of activated sludge. Eur. J. appl. Microbiol. 4, 185.

Ubukata Y. (1992). Kinetics of polymeric substrate removal by activated sludge: hydrolysis of polymers is the rate-determining step. Wat. Sci. Technol. 26, 2457.

Ullmann (1987). Encyclopedia of Industrial Chemistry. Vol. 9. pp. 353.

Van Esbroeck, H. (1984). An automatic ATP monitor for activated sludge characterization. J. Water Pollut. Control Fed., 56, 76.

Winkler, M.A. (1986). Tratamiento biológico de aguas de desecho. Ed. Limusa, S.A. México.

Wong, W.K. and Smith, D.W.(1992). Evaluation of an on-line specific oxygen uptake rate monitoring apparatus at the Gold Bar Wastewater Treatment Plant. *Environ. Technol.*, 13, 45.