

Uso de Enzimas de Tipo Ureasa en el Tratamiento de Aguas Residuales con Alto Contenido en Nitrógeno Orgánico

Sergio A. Pérez, Zulay M. Niño, Víctor Hernández y Carlos Hernández
Universidad de Carabobo, Facultad de Ingeniería, Escuela de Ingeniería Química,
Avda. Bolívar N°125-39, Valencia-Venezuela
(sperez@uc.edu.ve, znino@uc.edu.ve, carherna@uc.edu.ve)

Resumen

En este trabajo, algunas cepas de bacterias generadoras de enzimas de tipo ureasa, fueron utilizadas en el tratamiento de efluentes industriales contaminados con urea provenientes de un complejo petroquímico. Para el estudio, se realizó la caracterización del efluente líquido industrial, para conocer el nivel de nitrógeno orgánico presente, se identificaron las cepas generadoras de enzimas tipo ureasa y se establecieron las condiciones de laboratorio para desarrollar la cepa bacteriana. Los resultados demuestran la factibilidad de degradación del nitrógeno orgánico mediante el uso de las *Klebsiella pneumoniae* y *Proteus mirabilis*, al hidrolizar la urea para producir amoníaco y agua. Se determinó que la bacteria *Proteus mirabilis* asegura conversiones del nitrógeno orgánico superiores a 90 %. Del estudio cinético con la bacteria *Proteus mirabilis* se tiene que la reacción de biodegradación es de primer orden con constante de velocidad de $0,4185 \text{ h}^{-1}$ a $37 \text{ }^\circ\text{C}$.

Palabras claves: enzimas tipo ureasa, tratamiento de efluentes, Proteus mirabilis

Use of Urease Type Enzymes for the Treatment of Wastewater with a High Organic Nitrogen Content

Abstract

Some bacterial stock of the urease enzymes producer family were used, with the purpose of treating an industrial wastewater with urea content coming from a industrial urea complex, to reduce the organic nitrogen content to ammonia. To accomplish this objectives, a characterization of the wastewater was done, to identifies the organic nitrogen concentration present in the wastewater, the bacteria source generating the urease enzyme for the waste treatment were identified, and the conditions for the growth of the bacteria were established in the lab. The results show that it is possible the biodegradation using the urease enzymes kind, like *Klebsiella Pneumoniae* and *Proteus Mirabilis*, hydrolyzing the urea to ammonia and water. The *Proteus Mirabilis* was able to degrade the organic nitrogen with a conversion higher than 90%. From the kinetic study, the biodegradation reaction is a first order reaction with a constant kinetics rate of $0,4195 \text{ h}^{-1}$ at $37 \text{ }^\circ\text{C}$.

Keywords: enzyme urease type, wastewater treatment, Proteus mirabilis

INTRODUCCIÓN

Algunas plantas industriales existentes dentro de un complejo petroquímico, para la producción de fertilizantes generan efluentes líquidos, que por su naturaleza, contienen nitrógeno orgánico derivado de la urea, el cual, está asociado con el nitrógeno inorgánico derivado del amoníaco, y que suman en su conjunto cantidades importantes de nitrógeno total. Dependiendo de la presencia o no de sistemas de tratamiento de dichos efluentes, estos pueden superar los niveles de descargas permitidos.

En el complejo petroquímico bajo estudio, actualmente los efluentes generados contienen una cantidad de nitrógeno total aproximada de 5.000 ppm, valor este que supera los límites permisibles actuales (40 ppm), según lo establecido en las especificaciones exigidas por la norma ambiental vigente (Gaceta Oficial de Venezuela, 1995).

Normalmente el nitrógeno amoniacal puede ser eliminado del efluente líquido mediante procedimientos físico-químicos, pero sin embargo, el nitrógeno orgánico, no puede eliminarse por métodos convencionales, lo que conlleva a que el efluente final posea niveles de nitrógeno total elevados, cuando solamente es sometido a un tratamiento físico-químico (Reynolds y Richards, 1996; Lee y Lin, 2000). La biotecnología, en una forma amplia, se puede definir como la aplicación de organismos, componentes o sistemas biológicos para la obtención de bienes y servicios (Iañez, 2004; Valenzuela et al., 2003; Esposito et al., 1998).

En la presente investigación se propone el uso de herramientas de la biotecnología, a fin de realizar la evaluación de cepas bacterianas, para el tratamiento biológico de aguas residuales con alto contenido en nitrógeno orgánico. En este sentido, se realizó un estudio para identificar los microorganismos capaces, de transformar el nitrógeno orgánico contenido en efluentes industriales contaminados con urea, en compuestos simples susceptibles a ser despojados fácilmente por métodos físico-químicos; con la finalidad de lograr un efluente final cuyo contenido en nitrógeno total sea menor a 40 ppm.

MATERIALES Y METODOS

Caracterización del efluente líquido industrial

La caracterización del efluente industrial descargado por la planta objeto del estudio, se realizó durante un periodo de seis meses, con muestras recolectadas cada 15 días. Las principales variables analizadas fueron: pH, temperatura, nitrógeno total, nitrógeno amoniacal, nitrógeno orgánico, cloruro, hierro, aceite y dióxido de carbono. Adicionalmente se determinó el flujo de la descarga y se realizó un análisis bacteriológico del efluente (APHA, 1995).

Identificación y reactividad de las bacterias de tipo ureasa

Esta fase consistió en la selección de un grupo de bacterias potencialmente capaces de degradar el nitrógeno orgánico presente en el efluente industrial. Cada cepa de bacterias fue sometida a pruebas de resistencia térmica, identificación morfológica y reacciones de actividad bioquímica.

Para el estudio de reactividad bioquímica, realizado con el fin de diferenciar y evaluar la pureza de las cepas estudiadas, las siguientes pruebas fueron realizadas: reacción a la glucosa, reacción a la lactosa, reacción en agar simple, reacción al indol y reacción al caldo-urea (Crueger, 1993; Carmona, 1997; Iañez, 2004; García, 2005).

Evaluación de las bacterias seleccionadas

Una vez seleccionadas las cepas de bacterias con reacción urea positiva, se procedió a evaluar su capacidad de hidrólisis para determinar la bacteria que mejor realiza la degradación del nitrógeno orgánico presente en el efluente. Este ensayo se realizó usando una solución patrón de urea, equivalente a 5000 ppm de nitrógeno orgánico, en un medio caldo-urea, se tomaron muestras de 300

mL, las cuales fueron inoculadas con 10 mL de cada cepa urea positiva, por un período de incubación de 5 días a 37 °C. Al cabo de los 5 días se determinó el nitrógeno orgánico presente en las muestras para verificar la degradación de la urea en la muestra patrón.

Ajuste de las condiciones para el desarrollo continuo del medio biológico

En esta etapa se determinaron las condiciones apropiadas para el tratamiento biológico, en muestras del efluente, utilizando la bacteria seleccionada para realizar la hidrólisis de la urea, ajustando las variables de control de la reacción como: volumen de muestra, volumen de inóculo y pH. Se utilizó una temperatura de 37 °C.

En el desarrollo del caldo-urea, como medio de identificación de las bacterias urea positivas, se establece que la condición del medio de cultivo debe ser a pH 6,8; sin embargo, al considerar el carácter altamente alcalino del efluente, se realizó un ensayo para evaluar la incidencia de los cambios del pH en el medio de cultivo durante el proceso de degradación del nitrógeno orgánico. Para este caso específico se tomaron dos muestras, de 300 mL cada una, se inocularon con 10 mL de la bacteria seleccionada y a una de ellas no se le ajustó el pH del medio. Luego se determinó el desarrollo bacteriano y degradación de la urea después de 72 horas de incubación.

Para la determinación de la relación óptima entre el volumen de efluente y volumen de inóculo, se inocularon 6 muestras del efluente, de 300 mL cada una, con volúmenes de 10, 20, 30, 40, 50 y 60 mL de inóculo de la bacteria seleccionada; antes de inocular se reguló el pH a 7,0 utilizando para ello entre 2,5 a 3,0 mL de ácido sulfúrico concentrado.

Luego de inocular las muestras se realizó el conteo bacteriológico mediante el método de siembra de placas, a fin de medir la población inicial en cada muestra inoculada y la población luego de 72 horas de incubación. Para determinar la carga bacteriana presente en cada muestra se realizaron los análisis bacteriológicos mediante el test de coloración microbio quick test (García, 2005).

Estudio de degradación y cinético del nitrógeno ureico en medio controlado

Con el objetivo de determinar la velocidad de degradación del nitrógeno orgánico en el tiempo, se realizan ensayos utilizando muestras del efluente industrial, determinando la evolución de la concentración en función del tiempo a una temperatura de 37 °C. En esta fase se determina el orden de la reacción respecto al contenido del nitrógeno ureico y la constante de velocidad.

Determinación de la curva de crecimiento de la bacteria seleccionada.

Una vez establecidas las condiciones apropiadas para la biodegradación del nitrógeno ureico, se determina la curva de crecimiento de la bacteria seleccionada, para lo cual, en un medio controlado se inocula con la bacteria y se toman muestras a intervalos de tiempo regulares para cuantificar la población bacteriana presente.

La representación gráfica de los valores del logaritmo del número de bacterias/mL en función del tiempo, se corresponde a la curva de crecimiento bacteriano.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización del efluente líquido industrial

Los valores promedios, máximos, mínimos así como las respectivas desviaciones estándar obtenidos de la caracterización fisicoquímica, de un total de doce muestras compuestas recolectadas, se presentan en la Tabla 1. Los valores reportados para la desviación estándar de los diferentes tipos de nitrógeno indican una alta variabilidad, así como otros parámetros medidos, esto es debido a los cambios en las condiciones operacionales de la planta de urea del complejo petroquímico. Se tiene un flujo máximo de descarga de 26 L/s, descartándose la presencia de las bacterias estudiadas. Los valores promedios son considerados representativos para el período de estudio de seis meses.

Tabla 1: Caracterización del efluente industrial a biodegradar

Variable	Valor Mínimo	Valor Máximo	Valor Promedio	Desviación Estándar
pH	9,5	10,5	10,20	0,3
Cloruros (ppm)	30	145	74,08	36,4
Dióxido de carbono (ppm)	134	3300	1148,75	1011,0
Hierro (ppm)	0,05	0,75	0,29	0,2
Aceite (ppm)	0,1	226	23,29	65,1
N-Amoniacal (ppm)	400	6200	2788	1973,1
N-Ureico (ppm)	196	5300	2045	1808,3
N-Total (ppm)	621	6800	4833	2030,3
Temperatura (°C)	33	40	36,33	1,9
Flujo (L/s)	14	26	22,00	2,3
Presencia de bacterias	-	-	-	-

Tabla 2: Identificación morfológica de las bacterias utilizadas en el estudio

Cepas de estudio	Forma	Tamaño	Movilidad	Agrupación	Otros
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Bacilo	1.5 µm	Inmóvil	Aislado	Encapsulado sin esporas
<i>Proteus vulgaris</i>	Bacilo	2 µm	Móvil	Agrupados	Sin esporas ni cápsulas
<i>Proteus mirabilis</i>	Bacilo	2 µm	Móvil	Agrupados	Sin esporas ni cápsulas
<i>Helicobacter pilory</i>	Bacilo	2 µm	Móvil	Aislado	Encapsulado sin esporas

La reacción en caldo-urea, permite la diferenciación de microorganismos degradadores de urea capaces de utilizarla como única fuente de energía. De este ensayo se seleccionan las bacterias que resulten urea positivas, proporcionando un cambio de color del medio, de amarillo a rojo-púrpura, por viraje del indicador de pH, rojo de fenol.

De los resultados presentados en la Tabla 3 se observa que sólo las cepas de *Klebsiella pneumoniae* y *Proteus mirabilis* presentaron reacción positiva en medio caldo-urea, lo que las clasifica como urea positivas, mientras que las cepas de *Proteus vulgaris* y *Helicobacter pilory* no presentaron reacción positiva, por lo que se descarta su uso en las siguientes etapas de estudio. La reacción a la glucosa y a la lactosa, diferencia la *Klebsiella* del *Proteus mirabilis* y la reacción al Indol diferencia, el *Proteus mirabilis* del *Proteus vulgaris* y *Helicobacter pilory*.

Evaluación de las bacterias seleccionadas

Al comparar la acción de degradación entre las cepas *Klebsiella pneumoniae* y *Proteus mirabilis*, sobre una solución patrón de urea de concentración inicial de 5000 ppm, el *Proteus mirabilis* degrada en mayor magnitud al nitrógeno orgánico, que la *Klebsiella pneumoniae*, obteniéndose concentraciones finales de 3400 y 1200 ppm, respectivamente, al cabo de 72 horas. El pH final de la solución se mantuvo en 9,5 para la *Klebsiella* y 9,7 para el *Proteus*. En ambos casos se determinó un buen crecimiento de la población bacteriana.

Tabla 3: Reacciones de actividad bioquímica de las bacterias estudiadas

Ensayo de Identificación	Cepas de estudio			
	<i>Klebsiella Pneumoniae</i>	<i>Proteus Vulgaris</i>	<i>Proteus Mirabilis</i>	<i>Helicobacter Pilory</i>
Resistencia térmica	< 55 °C	< 60 °C	< 60 °C	< 60 °C
Reacción a la lactosa	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
Reacción a la glucosa	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
Reacción en Agar	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Reacción al Indol	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
Reacción al Caldo-Urea	Viraje a rojo positivo	Viraje a rojo ligero	Viraje a rojo positivo	Viraje a rojo ligero

Ajuste de las condiciones para el desarrollo continuo del medio biológico

Luego de seleccionar al *Proteus mirabilis*, como la fuente biológica, para el tratamiento del efluente final de la planta de urea, se procedió al ajuste de las variables del medio, sobre una muestra del efluente a tratar con concentraciones de 129, 4547 y 4676 ppm de nitrógeno amoniacal, orgánico y total respectivamente, y un pH de 9,4.

En relación al efecto del pH del efluente líquido sobre la capacidad de biodegradación de la fuente biológica seleccionada, a un valor de 9,4 (correspondiente al pH del efluente a tratar), al cabo de 5 días de tratamiento, el nitrógeno orgánico presente fue reducido de 4547 ppm a 2200 ppm. En un segundo ensayo, una vez acidulado el efluente hasta obtener un pH de 6,8, los resultados de la biodegradación muestran que al cabo de los 5 días, el nitrógeno orgánico fue reducido a 410 ppm. Estos resultados indican claramente que un pH alrededor de 6,8 favorece el proceso de biodegradación del nitrógeno orgánico.

Un segundo aspecto estudiado, fue la determinación de la población bacteriana requerida para la adecuada degradación del nitrógeno orgánico. A tal fin se realizaron ensayos para ajustar la relación óptima volumen de muestra, y la cantidad de bacterias presentes en el medio. Los resultados obtenidos en esta fase del trabajo son mostrados en la Tabla 4. En ella se observa que para volúmenes de muestra de 300 mL del efluente, conteniendo 4550 ppm de nitrógeno orgánico, a medida que se aumenta el volumen de inóculo, la población inicial de bacterias es mayor, pero no hay una reproducción apreciable de las mismas al cabo de un periodo de 72 horas, notándose igualmente una disminución en la población de bacterias a medida que se aumenta el volumen de inóculo en la muestra. Esta es producto del agotamiento del sustrato en un periodo de tiempo menor, dada la sobre población inicial de bacterias al utilizar un mayor volumen de inóculo.

El volumen de inóculo de bacteria óptimo obtenido fue de 10 mL, para el cual se tiene inicialmente una población bacteriana de 2170×10^7 NMP/100 mL (NMP; Numero Mas Probable), es decir, una relación volumétrica de 1 mL de inóculo por cada 30 mL de muestra. Esta condición permite un mejor desarrollo de las bacterias, alcanzando el nivel de población más alto e igual a 13330×10^7 NMP/100 mL, y garantizando la disponibilidad de biomasa necesaria para la degradación del nitrógeno orgánico.

Estudio de degradación y cinético del nitrógeno ureico en medio controlado.

Luego de fijar las condiciones del medio, se inocularon las muestras del efluente con la bacteria *Proteus Mirabilis*. Los resultados se muestran en la Fig. 1, donde se observa la degradación del nitrógeno orgánico del efluente en función del tiempo. La bacteria *Proteus mirabilis* logró degradar el

nitrógeno orgánico en un 94 % reduciendo la concentración desde 4570 ppm hasta 274 ppm, en un período de 72 horas. Igualmente se muestra la evolución del nitrógeno amoniacal y del nitrógeno total presente en el efluente.

Tabla 4: Cuantificación de la población bacteriana inicial y final de *Proteus Mirabilis*

Volumen Inoculo (mL)	Población Inicial (NMP/100mL)	Población Final (NMP/100mL)
10	2170 x 10 ⁷	13330 x 10 ⁷
20	6880 x 10 ⁷	6880 x 10 ⁷
30	4730 x 10 ⁷	4730 x 10 ⁷
40	6375 x 10 ⁷	1700 x 10 ⁷
50	10500 x 10 ⁷	301 x 10 ⁷
60	126000 x 10 ⁷	258 x 10 ⁷

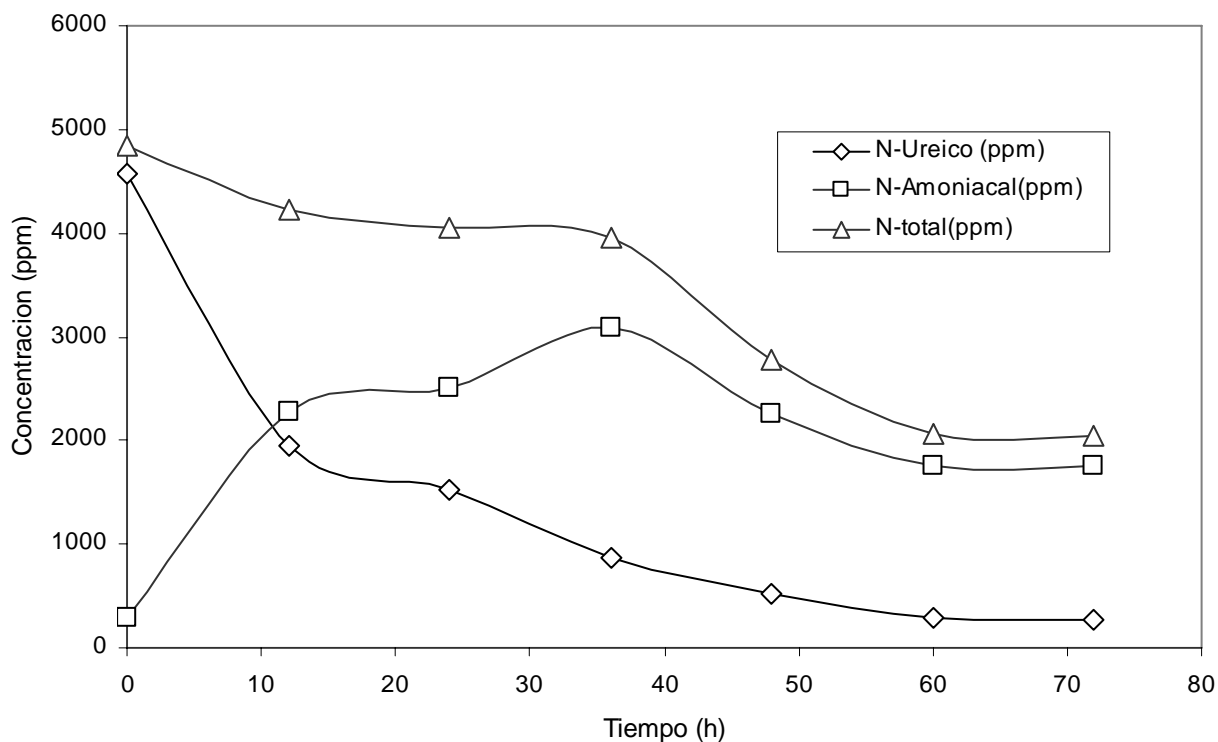


Fig. 1: Variación de los diferentes tipos de nitrógeno por la biodegradación con *Proteus mirabilis*

Desde el punto de vista cinético, en base a los resultados obtenidos de la concentración en función del tiempo, se determinó que la reacción es de primer orden respecto al nitrógeno orgánico, y a la temperatura de 37 °C tiene una constante de velocidad igual a de 0.4185 h⁻¹.

Determinación de la curva de crecimiento

La curva de crecimiento para el *Proteus Mirabilis* se muestra en la Fig. 2, donde se indican las diferentes fases de crecimiento de la bacteria: Latencia, Logarítmica, Estacionaria y Declinación.

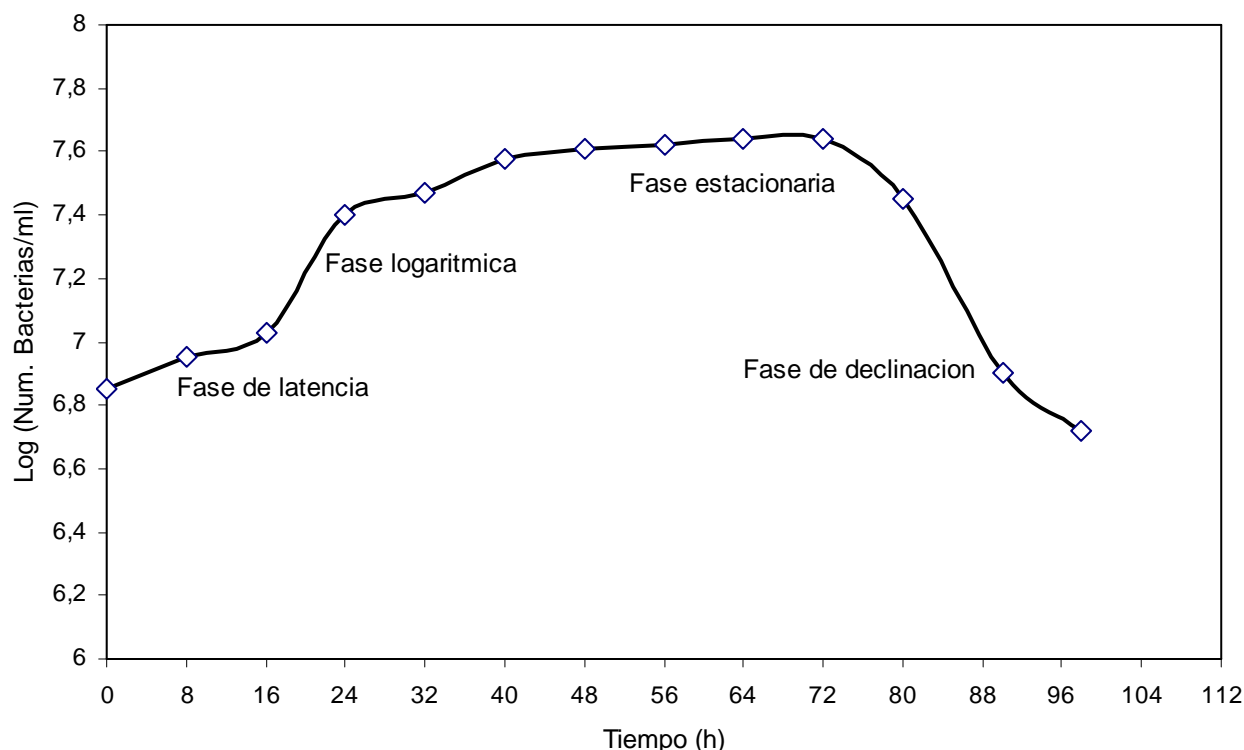


Fig. 2: Curva de crecimiento para la bacteria *Proteus mirabilis*

CONCLUSIONES

Del análisis de los resultados obtenidos durante las diferentes etapas del trabajo, se puede concluir lo siguiente:

El nitrógeno total promedio contenido en el efluente industrial, razón del estudio, es de 4833 ppm y está conformado de nitrógeno orgánico y nitrógeno amoniacal, en cantidades promedios de 2045 ppm y 2788 ppm respectivamente.

Mediante el uso de bacterias del tipo *Proteus mirabilis*, es posible lograr la degradación biológica del nitrógeno orgánico presente en efluentes contaminados con urea, con una eficiencia superior al 90 % al cabo de 5 días de biodegradación, a un pH óptimo de 6,8 y una relación de 1 mL de inóculo/30 mL de efluente a tratar.

El proceso de hidrólisis del nitrógeno orgánico contenido en el efluente industrial, mediante el tratamiento biológico con la bacteria *Proteus mirabilis*, sigue una cinética química de primer orden respecto a la concentración del nitrógeno orgánico, con una constante de velocidad de $0,4185 \text{ h}^{-1}$ a una temperatura de $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

La curva de crecimiento para la bacteria *Proteus mirabilis* presentó las diferentes fases de crecimiento para un lapso de estudio de 100 horas.

REFERENCIAS

APHA-American Public Health Association, *Standard methods for the examination of water and wastewater*, 19th Edition (1995).

Carmona, O.; *Microbiología*, 5ta. Edición, McGraw Hill Interamericana (1997).

Crueger, W.; *Biotecnología, Manual de Micro-biología Industrial*, Editorial Acribia, Zaragoza, España (1993).

Esposito, E., S.M. Paulillo y G.P. Manfio; *Biodegradation of the herbicide Diuron in soil by indigenous actinomycetes*, *Chemosphere*, 37(3) 541-549 (1998).

Gaceta Oficial de la Republica de Venezuela; *Normas para la Clasificación y el Control de la Calidad de los Cuerpos de Aguas y Vertidos o Efluentes Líquidos*, Decreto 883, Diciembre 18 (1995).

García, G.; *Instructivo del analizador biotech HMB para bacterias en agua de enfriamiento*, Disponible en <http://www.Biotechintl.com> (2005).

lañez, E., *Biotecnología*, Instituto de Biotecnología, Universidad de Granada (2004).

Lee, C.C. y S.D. Lin; *Handbook of Environmental Engineering Calculations*, McGraw-Hill (2000).

Reynolds T.D. y P.A. Richards; *Unit operations and processes in environmental engineering*, 2da. Edición, PWS Publisihing Co. (1996).

Valenzuela, M., O. Cerda y H. Toledo; *Overview on chemotaxis and acid resistance in Helicobacter Pilory*, *Biol. Res.*, 36, 429-436 (2003).