



---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**DEPURACIÓN DE AGUAS RESIDUALES DE UNA  
REFINERÍA DE PETRÓLEO EMPLEANDO UN  
REACTOR AEROBIO DE FLUJO CERRADO**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**P R E S E N T A:**

**SUSANA KARINA RAMÍREZ LUNA**



**MÉXICO D.F.**

**2008**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

---

*JURADO ASIGNADO*

*Presidente: Profesor Jorge Soto Soria*

*Vocal: Profesora Maria Del Pilar Granada Macías*

*Secretario: Profesor Víctor Manuel Luna Pabello*

*1er Suplente: Profesor Eduardo Bonilla Espinosa*

*2º Suplente: Profesor Luciano Hernández Gómez*

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Microbiología Experimental, del Departamento de Biología de la Facultad de Química, de la Universidad Nacional Autónoma de México.

DIRECTOR DE TESIS:

*Dr. Víctor Manuel Luna Pabello*

ASESOR TÉCNICO

*M. en C. Luciano Hernández Gómez*

---

## **AGRADECIMIENTOS**

*Al Dr. Víctor Manuel Luna Pabello, por darme la oportunidad de realizar este trabajo de tesis en el Laboratorio de Microbiología Experimental.*

*Al Q. A. Agustín Reyó, por orientarme y facilitarme el equipo utilizado para la determinación experimental de Nitrógeno Total en el Laboratorio 4-A perteneciente al departamento de Alimentos en la facultad de Química.*

*Se agradece el apoyo otorgado a través del Subprograma 127 Formación Básica en Investigación, en la Facultad de Química.*

*Se reconoce el apoyo otorgado por los proyectos PE-205706 “Desarrollo de prácticas avanzadas para la enseñanza de la Microbiología Ambiental.” y PAPIIT IN-215006-3 “Determinación de la capacidad desinfectante de aguas residuales domésticas usando agregados minerales naturales y artificiales conteniendo plata.”*

---

## GRACIAS...

**Estefanía y Susana**, porque sus raíces son los cimientos de lo que soy. Es un orgullo descender de mujeres tan increíbles.

**Mamá**, por tu confianza, apoyo y presencia en todo momento.

**Papá**, por ser un ejemplo en muchos aspectos de mi vida y un padre excepcional.

**Chío**, por ser la mejor hermana que alguien puede desear y la química que me gustaría ser cuando sea grande!

**Nor**, por definir la amistad con acciones durante todos estos años.

**Marco**, por tu confianza y cariño.

**Gabriel, Luis** (pecesito), **Hugo** (pelón), **Daleth, Itzel, Brenda, Marisol, Hugo, Rocha** y a todos aquellos que me dieron la mano y compartieron momentos inolvidables junto a mí.

**Ernesto y Patricia**, por la paciencia con la cual me compartieron sus conocimientos y experiencia.

A todos los integrantes del **LMBE**, por hacer que mi estancia en el laboratorio fuera divertida y enriquecedora.

---

## ÍNDICE GENERAL

<b>RESUMEN</b>	<b>10</b>
<b>CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>11</b>
<b>CAPÍTULO 2. HIPÓTESIS, OBJETIVOS Y ESTRATEGIA DE TRABAJO</b>	<b>12</b>
<b>2.1 Hipótesis</b>	<b>12</b>
<b>2.2 Objetivos</b>	<b>12</b>
<b>2.3 Estrategia de Trabajo</b>	<b>13</b>
<b>CAPÍTULO 3. MARCO TEÓRICO DE REFERENCIA</b>	<b>15</b>
<b>3.1 Problemática actual de la contaminación del agua</b>	<b>15</b>
<b>3.2 Tipos de contaminantes</b>	<b>18</b>
<b>3.3 Principales Contaminantes en Refinerías de Petróleo</b>	<b>20</b>
3.3.1 Compuestos azufrados como contaminantes del agua en refinerías petroleras	21
3.3.2 Compuestos fenólicos como contaminantes del agua en refinerías petroleras.	23
3.3.3 Compuestos nitrogenados como contaminantes del agua en refinerías petroleras	24
<b>3.4 Normatividad aplicable</b>	<b>25</b>
<b>3.5 Tratamiento de aguas residuales</b>	<b>26</b>
3.5.1 Sistemas de tratamiento biológicos de aguas residuales	28
3.5.2 Tratamiento Biológico del Agua Residual de Refinerías de Petróleo.	29
<b>3.6 Biodegradabilidad</b>	<b>30</b>
3.6.1 Conceptos generales	30
3.6.2 Prueba de Biodegradabilidad Aerobia Rápida OECD 301 A.	33
<b>3.7 Toxicidad aguda</b>	<b>33</b>
3.7.1 Aspectos generales	33
3.7.2 Ensayos de toxicidad aguda por contacto	35
3.7.3 Plantas terrestres, prueba de crecimiento OECD 208	36
<b>CAPÍTULO 4. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>37</b>
<b>4.1 Muestra</b>	<b>37</b>

---

<b>4.2</b>	<b>Reactivos</b> -----	<b>38</b>
<b>4.3</b>	<b>Inóculo</b> -----	<b>38</b>
<b>4.4</b>	<b>Reactor y condiciones de operación</b> -----	<b>39</b>
<b>4.5</b>	<b>Prueba de biodegradabilidad</b> -----	<b>41</b>
<b>4.6</b>	<b>Prueba de toxicidad aguda por contacto empleando al ciliado <i>Colpoda cucullus</i>.</b> -----	<b>41</b>
<b>4.7</b>	<b>Prueba de Toxicidad aguda empleando <i>Lactuca sativa L.</i></b> -----	<b>42</b>
<b>4.8</b>	<b>Técnicas y equipos utilizados para la caracterización de la muestra</b> -----	<b>43</b>
4.8.1	Caracterización fisicoquímica-----	43
4.8.2	Caracterización microbiológica-----	44
<b>CAPÍTULO 5. PRIMERA ETAPA EXPERIMENTAL</b> -----		<b>45</b>
<b>5.1</b>	<b>Análisis y discusión de resultados</b> -----	<b>45</b>
5.1.1	Caracterización Fisicoquímica-----	45
5.1.2	Caracterización Microbiológica de la Muestra.-----	47
5.1.3	Determinación del tiempo total de tratamiento.-----	47
<b>5.2</b>	<b>Conclusiones primera etapa experimental</b> -----	<b>49</b>
<b>CAPÍTULO 6. SEGUNDA ETAPA EXPERIMENTAL</b> -----		<b>50</b>
<b>6.1</b>	<b>Análisis y discusión de resultados</b> -----	<b>50</b>
6.1.1	Caracterización Microbiológica del Inóculo-----	50
6.1.2	Biodegradabilidad de la Muestra.-----	51
6.1.3	Toxicidad aguda de la Muestra.-----	55
6.1.4	Remoción de Contaminantes.-----	58
<b>6.2</b>	<b>Conclusiones segunda etapa experimental</b> -----	<b>61</b>
<b>CAPÍTULO 7. COCLUSIONES GENERALES Y RECOMENDACIONES</b> -----		<b>62</b>
<b>7.1</b>	<b>CONCLUSIONES GENERALES</b> -----	<b>62</b>
<b>7.2</b>	<b>RECOMENDACIONES</b> -----	<b>63</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> -----		<b>64</b>

---

---

<b>ANEXOS</b>	<b>68</b>
ANEXO A. OECD 301 A. "PRUEBA DE BIODEGRADABILIDAD AEROBIA RÁPIDA"	68
ANEXO B. ENSAYOS DE TOXICIDAD	72
ANEXO C. DETERMINACIÓN DE DQO. MÉTODO DE REFLUJO CERRADO	78
ANEXO D. DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES	82
ANEXO E. DETERMINACIÓN DE NITRÓGENO TOTAL	86
ANEXO F. DETERMINACIÓN DE IÓN SULFATO	91
ANEXO G. DETERMINACIÓN DE SULFUROS	94
ANEXO H. DETERMINACIÓN DE DBO <sub>5</sub>	97
ANEXO H. DETERMINACIÓN DE COLIFORMES TOTALES	103



---

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de la estrategia de trabajo empleada. ....	14
Figura 2. Diagrama de proceso general en una refinería de petróleo. ....	20
Figura 3. Ciclo del azufre. ....	22
Figura 4. Ciclo del nitrógeno. ....	24
Figura 5. Plano correspondiente a la PTAR de la refinería Antonio M. Amor de PEMEX. ....	37
Figura 6. Fotografías tomadas en la zona de muestreo. ....	38
Figura 7. Diagrama de procedimiento para obtener la cantidad de sólidos suspendidos totales en el inóculo. ....	39
Figura 8. Esquema del reactor aerobio de flujo cerrado empleado. ....	40
Figura 9. Esquema general del procedimiento de la prueba de toxicidad aguda. ....	42
Figura 10. Gráfica de datos obtenidos para determinar el tiempo total de tratamiento. ....	48
Figura 11. Microorganismos presentes en el inóculo utilizado. ....	51
Figura 12. Gráfica de biodegradabilidad de la muestra de agua sin tratamiento aerobio. ....	52
Figura 13. Gráfica de remoción de DQO obtenida para los controles utilizados durante la prueba de biodegradabilidad aplicada a la muestra sin tratamiento aerobio. ....	53
Figura 14. Gráfica de biodegradabilidad de la muestra después del tratamiento aerobio. ....	53
Figura 15. Gráfica de remoción de DQO obtenida para los controles utilizados durante la prueba de biodegradabilidad aplicada a la muestra después del tratamiento aerobio. ....	54
Figura 16. Gráfica comparativa del porcentaje de germinación obtenido al aplicar la prueba de toxicidad aguda OECD 208 antes y después del tratamiento aerobio. ....	56
Figura 17. Gráfica comparativa del porcentaje de crecimiento obtenido al aplicar la prueba de toxicidad aguda OECD 208 antes y después del tratamiento aerobio. ....	57
Figura 18. Gráfica comparativa de los porcentajes de remoción obtenidos para cada uno de los cuatro contaminantes durante el tratamiento biológico aerobio. ....	59
Figura 19. Esquemas de plántula de <i>Lactuca sativa</i> L. ....	73

---

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Clasificación de la calidad del agua superficial utilizando $\text{DBO}_5$ , DQO y SST como indicadores de contaminación. ....	16
Tabla 2. Descargas de aguas residuales municipales y no municipales en 2006. ....	17
Tabla 3. Etapas generales en el tratamiento de aguas residuales. ....	27
Tabla 4. Biodegradabilidad de acuerdo a la relación $\text{DBO}_5/\text{DQO}$ ....	32
Tabla 5. Caracterización de la muestra inicial. ....	45
Tabla 6. Análisis microbiológico del agua de refinería. ....	47
Tabla 7. Remoción acumulada de DQO en el reactor aerobio. ....	48
Tabla 8. Análisis microbiológico del contenido del reactor al tiempo cero. ....	50
Tabla 9. Biodegradabilidad de la muestra de agua sin tratamiento aerobio. ....	51
Tabla 10. Remoción de DQO obtenida para los controles utilizados durante la prueba de biodegradabilidad aplicada a la muestra sin tratamiento aerobio. ....	52
Tabla 11. Biodegradabilidad de la muestra de agua después del tratamiento aerobio. ....	53
Tabla 12. Remoción de DQO obtenida para los controles utilizados durante la prueba de biodegradabilidad aplicada a la muestra después del tratamiento aerobio. ....	53
Tabla 13. Resultados obtenidos de la prueba de toxicidad aguda por contacto. ....	55
Tabla 14. Resultados del porcentaje de germinación obtenidos al aplicar la prueba de toxicidad aguda OECD 208, antes y después de airear por 30 días. ....	56
Tabla 15. Resultados del porcentaje de crecimiento obtenidos al aplicar la prueba de toxicidad aguda OECD 208, antes y después de airear por 30 días. ....	57
Tabla 16. Resultados obtenidos para cada contaminante seleccionado a diferentes tiempos de tratamiento en el reactor aerobio. ....	58
Tabla 17. Condiciones de la prueba de toxicidad aguda. ....	75
Tabla 18. Índice del NMP y límite confiable de 95% para varias combinaciones de resultados positivos y negativos cuando se usan: 3 tubos con porciones de 10 mL, 3 tubos con porciones de 1mL y 3 tubos con porciones de 0.1mL. ....	106

---

## RESUMEN

En el presente trabajo se plantea la posibilidad de utilizar procesos de aireación que favorezcan la proliferación de diversos microorganismos capaces de llevar a cabo la biodegradación de algunos de los contaminantes presentes en una muestra de agua residual proveniente de la Refinería de Petróleos Mexicanos Ing. Antonio M. Amor (Salamanca, Guanajuato) para que su calidad final sea aceptable de acuerdo a la normatividad aplicable. Para cumplir con este reto, fue necesario establecer dos etapas experimentales. En la primera se realizó la caracterización fisicoquímica y microbiológica de la muestra además de establecer un tiempo total de 30 días de tratamiento. Los parámetros fisicoquímicos seleccionados en la caracterización de la muestra fueron pH, demanda bioquímica de oxígeno, demanda química de oxígeno, cantidad de sulfatos, sulfuros, compuestos fenólicos y nitrogenados; considerando a los últimos cuatro como referencia para evaluar la remoción de contaminantes después del tratamiento aerobio y principalmente por el impacto ambiental que representa la descarga excesiva de éstos a cuerpos receptores. En la segunda etapa experimental se realizó el montaje del reactor aerobio bajo las mismas condiciones de aireación, temperatura e inóculo, extrayendo las muestras necesarias para monitorear la depuración de contaminantes durante el tratamiento y obteniendo porcentajes de remoción máximos para sulfatos, fenoles, nitrógeno total y sulfuros de 61%, 76%, 73% y 19% respectivamente. La determinación de la biodegradabilidad y toxicidad del agua en estudio se realizó antes y después de someter la muestra al proceso aerobio con la finalidad de conocer el efecto del tratamiento sobre estos parámetros, sin observar cambios por el tratamiento sobre la velocidad de degradación ni la toxicidad.

---

## **CAPÍTULO 1.**

### **INTRODUCCIÓN**

El uso del agua en las actividades cotidianas, ha afectado en la calidad y cantidad de ésta en los depósitos naturales, repercutiendo directamente a la economía y bienestar social. En consecuencia, la investigación del recurso hídrico en todo el mundo ha tenido un gran impulso en las últimas décadas, convirtiendo el tema de la contaminación ambiental en un tópico de preocupación generalizada, en cuanto a sus causas, consecuencias y posibles soluciones.

Actualmente un gran número de empresas en diversas áreas industriales están contribuyendo a la depuración del agua que utilizan; la industria petrolera en México no es la excepción, sin embargo, el porcentaje de agua que es tratada para ser reutilizada en comparación con la cantidad de agua que se gasta día a día no es suficiente para regenerar éste recurso (CONAGUA, 2006).

Como propuesta para dar solución a este conflicto, se han desarrollado diversas tecnologías encaminadas a la remoción de contaminantes. De entre ellas, las de tipo biológico, han demostrado ser las que generan menores cantidades de subproductos no deseados y permiten la reutilización del recurso afectado (Miranda, 2007).

Específicamente, el estudio que se presenta a continuación se enfoca en depuración de aguas residuales provenientes de la Refinería de Petróleo Ing. Antonio M. Amor, ubicada en Salamanca, Guanajuato; perteneciente a Petróleos Mexicanos (PEMEX), y los sistemas biológicos empleados para eliminar la presencia de diversos compuestos contaminantes como los fenólicos, nitrogenados y azufrados.

A lo largo del presente trabajo, se describen las metodologías y herramientas utilizadas para llegar a una propuesta de optimización en el tratamiento biológico de las aguas residuales, generadas en la refinería mencionada, con la finalidad de mejorar la calidad del recurso hídrico que es descargado por dicha industria.

---

## CAPÍTULO 2.

### HIPÓTESIS, OBJETIVOS Y ESTRATEGIA DE TRABAJO

#### 2.1 Hipótesis

Las aguas residuales procedentes de una refinería de petróleo, al ser sometidas a aireación permanente en presencia de microorganismos, reducen su contenido de contaminantes orgánicos y disminuyen su toxicidad aguda.

#### 2.2 Objetivos

##### *Objetivo General*

Determinar la biodegradabilidad y toxicidad aguda de las aguas residuales de una refinería de petróleo antes y después de ser tratadas aerobiamente.

##### *Objetivos Particulares*

- 1) Caracterizar fisicoquímicamente una muestra de agua proveniente de una refinería de petróleo.
- 2) Evaluar el porcentaje de remoción de contaminantes presentes en las aguas residuales procedentes de una refinería, mediante el uso de reactores aerobios de flujo cerrado.
- 3) Determinar los principales grupos de microorganismos presentes en el reactor aerobio de flujo cerrado.
- 4) Determinar, a partir de la aplicación del procedimiento OECD 301 A (Prueba de Biodegradabilidad Aerobia Rápida), la biodegradabilidad de las aguas residuales de una refinería de petróleo antes y después de ser tratadas aerobiamente.

- 
- 5) Determinar, mediante el procedimiento OECD 208 “Terrestrial plants, growth test” (Plantas terrestres, prueba de crecimiento), la toxicidad aguda de las aguas residuales de una refinería de petróleo antes y después de ser tratadas aerobiamente.

## 2.3 Estrategia de Trabajo

El presente estudio evalúa la biodegradabilidad y toxicidad aguda de una muestra de agua proveniente de una refinería de petróleo antes y después de someterla a un proceso de aireación en un reactor de flujo cerrado. La determinación del tiempo de residencia hidráulica en el reactor se realizó mediante la inoculación de la muestra, manteniendo una aireación constante y midiendo el porcentaje de remoción de la demanda química de oxígeno a diferentes tiempos para establecer la duración total del tratamiento a partir de la curva obtenida.

Para realizar las pruebas mencionadas, se caracterizó fisicoquímica y microbiológicamente la muestra y se aplicaron las pruebas de biodegradabilidad (OECD 301A *Prueba de biodegradabilidad aerobia rápida*) y toxicidad (OECD 208 *Plantas terrestres, prueba de crecimiento*), reconocidas internacionalmente. Dentro de la caracterización fisicoquímica se contempló la determinación de algunos parámetros indicados en la NOM-001-SEMARNAT-1996 incluyendo, en el caso de los contaminantes básicos, nitrógeno total, sulfatos, sulfuros y fenoles; por su participación dentro de los ciclos biogeoquímicos y el impacto negativo que implica la descarga excesiva de los mismos a la naturaleza. Se consideraron también el pH y la demanda bioquímica de oxígeno como parámetros complementarios considerando que, al ser un tratamiento biológico, las condiciones del medio pueden afectar directamente a la población microbiana del inóculo utilizado. En cuanto a los contaminantes clasificados como patógenos y parasitarios, se seleccionó la determinación del número más probable de coliformes totales en la muestra para confirmar la confluencia de residuales provenientes del proceso de refinación y generadas por actividades humanas. De manera complementaria se realizó la caracterización microbiológica del inóculo con la finalidad de conocer la microbiota

presente en el reactor. Esta caracterización incluye la observación microscópica a de los protozoarios en el inóculo así como la tinción Gram de la población bacteriana en éste.

A partir de los datos recolectados de cada una de las pruebas fue posible conocer el efecto del tratamiento biológico aerobio sobre una muestra de agua residual proveniente de una refinería de petróleo.

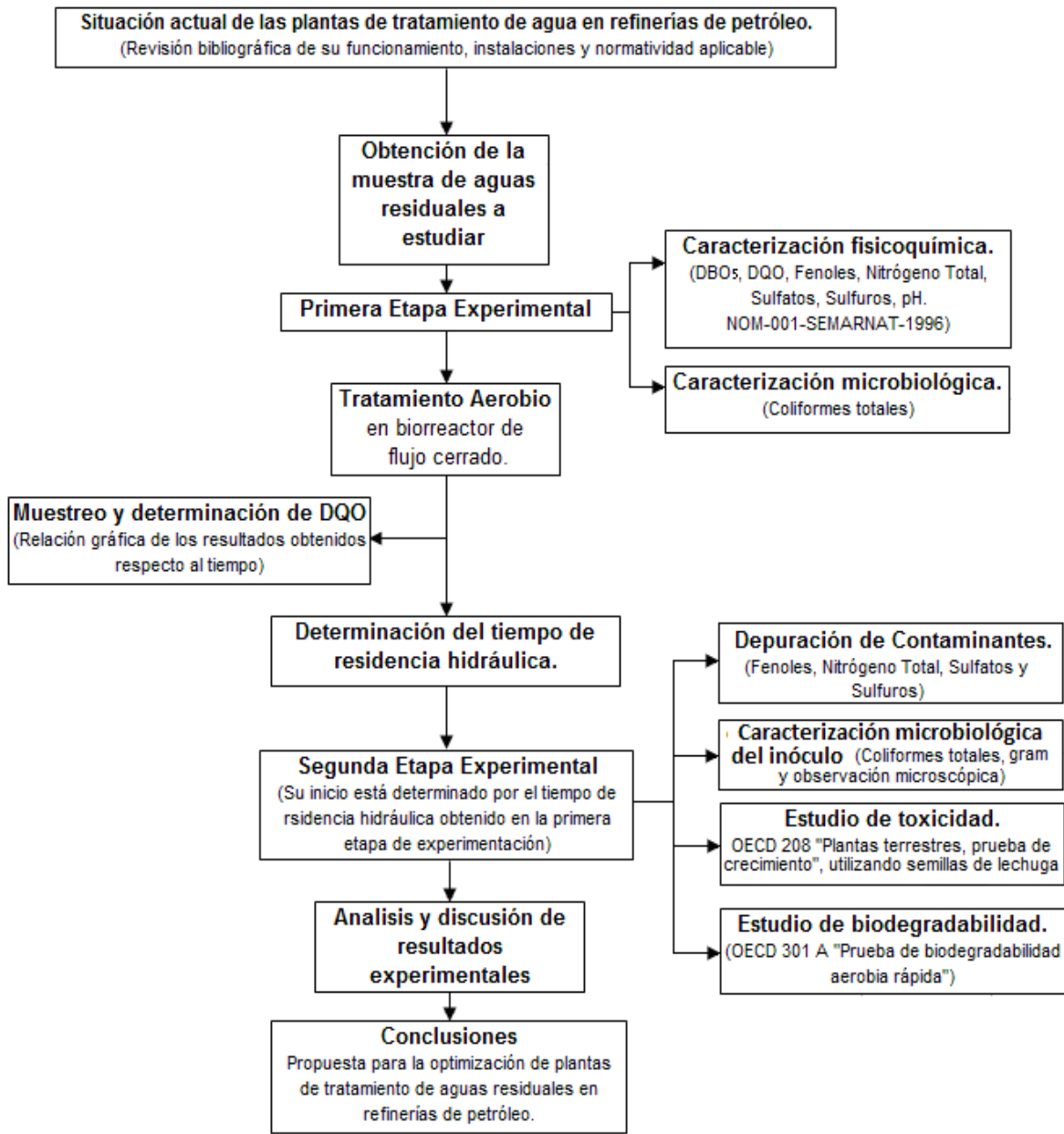


Figura 1. Diagrama de la estrategia de trabajo empleada.

---

## CAPÍTULO 3.

### MARCO TEÓRICO DE REFERENCIA

En éste capítulo se proporcionará un panorama general acerca de la contaminación del agua en refinerías de petróleo, los contaminantes de mayor interés, su impacto ambiental y los tratamientos para su depuración; haciendo hincapié en los de tipo biológico e incluyendo los principales factores que influyen en la biodegradación y toxicidad de los mismos, así como la legislación ambiental asociada a éstos. Finalmente, se incluyen generalidades acerca de las técnicas OECD utilizadas para evaluar la biodegradabilidad y toxicidad de la muestra en estudio.

#### 3.1 Problemática actual de la contaminación del agua

La mayoría de las corrientes y masas de agua superficial se están contaminando rápidamente en mayor o menor grado. El 63% del agua utilizada en el país proviene de estas fuentes (ríos, arroyos y lagos), mientras que el 37% restante proviene de fuentes subterráneas o acuíferos (CONAGUA, 2006).

La urgencia por solucionar ésta situación generó que hace unas décadas diferentes organismos a nivel internacional comenzaran a legislar la descarga de aguas residuales a cuerpos receptores. Sin embargo, para remediar el daño ambiental que causan las diversas actividades antropogénicas, es necesario optimizar constantemente los procesos de depuración del agua que es descargada a las fuentes de abastecimiento principales.

Actualmente, se utilizan tres indicadores de calidad de agua, la demanda bioquímica de oxígeno ( $DBO_5$ ); que determina la cantidad de materia orgánica biodegradable, la demanda química de oxígeno (DQO); que determina la cantidad total de materia orgánica, y la cantidad de sólidos suspendidos totales (SST). El incremento en la concentración de estos parámetros incide en la disminución del contenido de oxígeno



disuelto en los cuerpos de agua con la consecuente afectación a los ecosistemas acuáticos y posteriormente a todos los demás.

Tabla 1 Clasificación de la calidad del agua superficial utilizando DBO<sub>5</sub>, DQO y SST como indicadores de contaminación.

ESCALAS DE CLASIFICACIÓN DE LA CALIDAD DEL AGUA			
Demanda Bioquímica de Oxígeno (mg/L)	Demanda Química de Oxígeno (mg/L)	Sólidos Suspendidos Totales (mg/L)	Clasificación
$DBO_5 \leq 3$	$DQO \leq 10$	$SST_5 \leq 25$	Excelente No contaminada
$3 < DBO_5 \leq 6$	$10 < DQO \leq 20$	$25 < SST \leq 75$	Buena calidad Bajo contenido de materia orgánica biodegradable
$6 < DBO_5 \leq 30$	$20 < DQO \leq 40$	$75 < SST \leq 150$	Aceptable Con indicio de contaminación. Capacidad de autodepuración o con descargas de aguas residuales tratadas biológicamente.
$30 < DBO_5 \leq 120$	$40 < DQO \leq 200$	$150 < SST \leq 400$	Contaminada Con descargas de aguas residuales crudas de origen municipal
$DBO_5 >$	$DQO > 200$	$SST > 400$	Fuertemente contaminada Con fuerte impacto de aguas residuales crudas municipales y no municipales

NOTA: Las clasificaciones de la tabla se refieren a aguas de tipo superficial.

FUENTE: CONAGUA, Subdirección General Técnica, 2006

La Comisión Nacional del Agua (CONAGUA) ha establecido un sistema de clasificación de la calidad del agua superficial en base a los tres criterios mencionados en la Tabla 1, haciendo también una división de las aguas residuales de acuerdo a su origen y ubicación de la siguiente manera:

- No municipal. Agua residual proveniente de la industria autoabastecida, es decir, que toma su agua directamente de los ríos, arroyos, lagos o acuíferos del país, se considera de tipo no municipal (industria química y la producción de azúcar, **petróleo**, celulosa y papel).
- Municipal. Aguas residuales manejadas en los sistemas de alcantarillado urbanos y rurales.

Actualmente, la infraestructura del país dedicada al tratamiento y potabilización del agua cuenta con 491 plantas potabilizadoras en operación, 1593 plantas de tratamiento de aguas residuales municipales y 1868 plantas de tratamiento de aguas residuales industriales (CONAGUA, 2006).

Las plantas depuradoras construidas para tal efecto, usualmente funcionan al 60% de su capacidad logrando entre el 40 y 60% de remoción de los contaminantes de tipo carbonoso presentes en solución. Sin embargo, el resto del volumen de agua residual no depurado, ocasiona problemas de enriquecimiento de nutrientes y con ello, se tiene como consecuencia el abatimiento de la calidad del cuerpo de agua receptor (Miranda, 2007).

Tabla 2. Descargas de aguas residuales municipales y no municipales en 2006.

<b>DESCARGAS MUNICIPALES</b>		
Aguas residuales	7.63	km <sup>3</sup> /año (242 m <sup>3</sup> /s)
Se recolectan en alcantarillado	6.50	km <sup>3</sup> /año (206 m <sup>3</sup> /s)
Se tratan	2.35	km <sup>3</sup> /año (74.4 m <sup>3</sup> /s)
Se generan	2.06	Millones de toneladas de DBO <sub>5</sub> al año
Se recolectan	1.75	Millones de toneladas de DBO <sub>5</sub> al año
Se remueven del sistema de alcantarillado	0.52	Millones de toneladas de DBO <sub>5</sub> al año
<b>DESCARGAS NO MUNICIPALES (Incluyendo a la Industria)</b>		
Aguas residuales	5.77	km <sup>3</sup> /año (183 m <sup>3</sup> /s)
Se tratan	0.87	km <sup>3</sup> /año (27.7 m <sup>3</sup> /s)
Se generan	6.74	Millones de toneladas de DBO <sub>5</sub> al año
Se remueven del sistema de alcantarillado	0.82	Millones de toneladas de DBO <sub>5</sub> al año

Fuente: CONAGUA, Subdirección General de Agua Potable y Drenaje y Saneamiento, y Subdirección General Técnica, 2006.

Con base en la información contenida en la Tabla 2, se puede afirmar que de los 183m<sup>3</sup> de agua residual no municipal descargada por segundo, sólo se trata el 15.22%, concluyendo que las velocidades de generación y tratamiento no están balanceadas. Por tal hecho, diversas industrias, incluyendo a la de refinación, se han

---

comprometido ha colaborar para dar solución dicha situación. En noviembre de 2007 el Grupo Directivo de PEMEX autorizó la “Estrategia de Protección Ambiental”, donde la empresa se compromete a cumplir la normatividad que le aplica así como a eliminar los riesgos ambientales que dicha industria representa. Los proyectos a seguir tienen como objetivos diferentes temas de relevancia ambiental entre los que se encuentra el “uso eficiente del agua”. Término que engloba todas aquellas inversiones que PEMEX ha realizado desde hace 8 años para mejorar la calidad del agua tratada y lograr un incremento del agua reciclada utilizada en sus operaciones. A la fecha, se considera que, para la refinería de PEMEX en Salamanca, la mejor manera de prevenir los impactos al entorno ambiental es mediante el control de las fuentes de contaminación, la incorporación de tecnología más avanzada para el diseño de plantas de proceso y la optimización de los sistemas utilizados para el tratamiento de contaminantes (PEMEX, Informe, 2007).

### **3.2 Tipos de contaminantes**

Un contaminante se considera como cualquier sustancia en cantidad suficiente para que cause efectos dañinos mensurables en el ecosistema. La presencia en el medio ambiente de uno o más contaminantes, o cualquiera combinación de ellos, que perjudiquen el bienestar humano, flora y fauna, degraden la calidad del aire, del agua, de la tierra, de los bienes, de los recursos de la nación en general o de particulares, se considera como contaminación. Estableciendo que ésta puede tener impacto en atmósfera, agua y suelo o biosfera (Lomelí, 2008).

Los contaminantes del agua se dividen en tres según los factores que la ocasionan:

- Físicos

Son sólidos en suspensión, material coloidal, así como residuos oleaginosos, espumas y calor (contaminación térmica), que afectan el aspecto del agua y evitan la penetración de la luz afectando directamente los procesos fotosintéticos; además, cuando estos sólidos flotan o sedimentan interfieren con la flora y fauna acuáticas. Entre este tipo de contaminantes se encuentran arenas, arcillas, tierra, cenizas,

---

materia vegetal agrícola, grasas, brea, papel, hule, plásticos, madera y metales (Ambriz,1998; Belloc, 2007).

- Químicos

Incluyen compuestos orgánicos e inorgánicos disueltos o dispersos en el agua. Los principales son cloruros, sulfatos, nitratos, carbonatos, pesticidas, metales pesados, detergentes, fenoles, así como desechos ácidos, alcalinos y gases tóxicos disueltos en el agua como los óxidos de azufre, de nitrógeno, amoníaco, cloro y sulfuro de hidrógeno. Gran parte de estos contaminantes son liberados directamente a la atmósfera y bajan arrastrados por la lluvia, interfiriendo o anulando la acción microbiana sobre los contaminantes orgánicos y químicos de las aguas (Belloc, 2007).

- Biológicos

El crecimiento desproporcionado de diferentes bacterias, hongos, parásitos, algas, plantas acuáticas, así como la introducción de especies animales o vegetales extrañas, rompe el equilibrio de cualquier ecosistema. El incremento en las concentraciones de nutrimentos, ocasiona que el balance de las poblaciones microbianas sea alterado, en consecuencia, se favorece la proliferación de un determinado grupo de microorganismos que, si bien pueden no ser patógenos, incrementan el consumo de oxígeno disuelto en el agua de manera que se inicia el fenómeno conocido como eutrofización (Miranda, 2007).

De acuerdo a la NOM-001-SEMARNAT-1996, los contaminantes del agua se clasifican en básicos y patógenos y parasitarios. El primer grupo incluye las grasas y aceites, materia flotante, sólidos sedimentables, sólidos suspendidos totales, demanda bioquímica de oxígeno 5, nitrógeno total, fósforo total, temperatura y pH. En el grupo de patógenos y parasitarios, se considera a los coliformes fecales y los huevos de Helminto como indicadores confiables de contaminación por englobar a todos aquellos microorganismos, quistes y huevos de parásitos que pueden estar presentes en las aguas residuales y que representan un riesgo a la salud humana, flora o fauna.

### 3.3 Principales Contaminantes en Refinerías de Petróleo

Dentro de las industrias primarias que más contribuyen en la transformación de la materia se encuentra la industria química, siderúrgica y cementera. La refinación del petróleo se encuentra dentro de la industria química primaria, de la cual, se obtienen grandes beneficios ocasionado severos cambios en el medio ambiente. Esta industria, como muchas otras en constante cambio, ha desarrollado programas de seguridad laboral así como de protección ambiental (Alva, 2007).

Se sabe que el crudo es una mezcla de diversos hidrocarburos (parafinas, naftenos, olefinas, compuestos aromáticos), compuestos nitrogenados, azufrados, oxigenados y, usualmente, trazas de vanadio, níquel, sodio y arsénico. Todos estos compuestos pueden afectar las condiciones de los sistemas de proceso y la calidad de los productos refinados, por lo que el eje principal de la refinación se centra en la separación de productos y la eliminación de contaminantes (Mohamed, 2006).

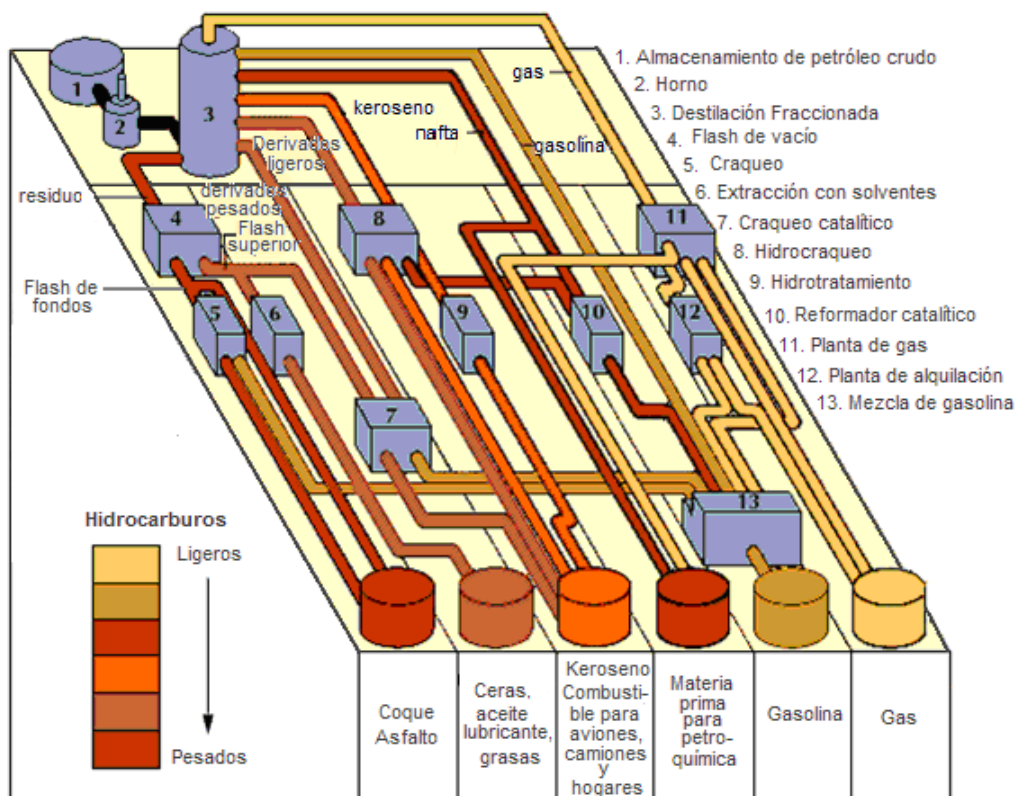


Figura 1. Diagrama de proceso general en una refinería de petróleo. Tomado de Enciclopedia Británica, 2007.

---

Específicamente en la Refinería de PEMEX, Salamanca, se elaboran 42 productos terminados por medio de 53 plantas de proceso que incluyen destilación atmosférica, destilación a vacío, planta de metil terburil éter, de hidrotratamiento de destilados intermedios, de azufre y tratamiento de gas de cola, isomerización de pentanos, alquilación de butano butileno, además de la planta de tratamiento de aguas urbano-industriales, que se incluye en el llamado paquete ecológico (PEMEX, Refinación, 2007).

La refinación del petróleo utiliza relativamente grandes cantidades de agua para sistemas de enfriamiento y calentamiento, desalación de agua, arrastre de vapor, mantenimiento y lavado normal (Mohamed, 2006). En consecuencia, se generan grandes volúmenes de agua residual (0.4-1.6 veces el volumen de crudo procesado) que contienen diferentes cantidades de compuestos originados en el proceso así como sustancias que no provienen de la refinación como tal sino del resto de las actividades realizadas en esta industria. Dependiendo del tipo de crudo, composición y procesos de tratamiento, las características de las residuales de refinería varían en función de dichos factores. Esta complejidad en su composición es precisamente lo que hace factible su tratamiento por una o más combinaciones de procesos (Coelho, 2006).

Diversos estudios en la literatura reportan la composición del agua residual de refinería en términos de DBO y DQO (Cohelo, 2007; Mohamed, 2006; Levent, 2007). Estos parámetros, aún cuando son indicadores confiables de la calidad del agua, no proporcionan la composición específica y completa de las residuales, misma que debería ser considerada en el diseño y la evaluación de las etapas del tratamiento (Mohamed, 2006).

### ***3.3.1 Compuestos azufrados como contaminantes del agua en refinerías petroleras***

Los compuestos azufrados generalmente contienen al elemento en tres estados de oxidación: sulfuros ( $S^{2-}$ ), estado de oxidación  $2^-$ ; sulfato ( $SO_4^{2-}$ ), en  $4^+$  y azufre en

estado elemental ( $S^0$ ). El azufre en estado  $2^-$  es un componente integral de las proteínas. Muchos microorganismos son capaces de reducir los sulfatos a sulfuros bajo condiciones aerobias (reducción asimilatoria de sulfatos) y anaerobias (reducción disimilatoria de sulfatos). El azufre contenido en las biomoléculas regresa al ciclo mediante la liberación de éste en forma de  $H_2S$ . Este sulfuro de hidrógeno formado por ambos procesos reacciona, en parte, con algunos metales del medio para formar minerales azufrados. Otra parte del azufre, regresa a sulfato bajo condiciones aerobias mediante la oxidación de  $H_2S$  mediada por microorganismos capaces de utilizar tal compuesto como fuente de energía durante el crecimiento y reproducción (Chapelle, 1993).

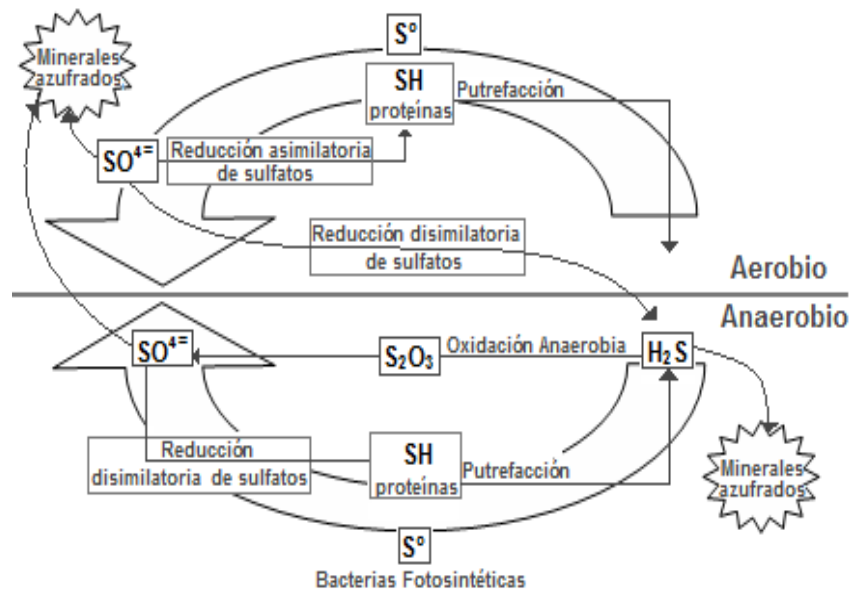


Figura 2. Ciclo del azufre.  
Tomado de Chapelle, 1993

El contenido de azufre en el crudo de petróleo, en forma de  $H_2S$  y mercaptanos ( $R-SH$ ) principalmente, debe ser removido eficientemente para evitar la propagación de olores desagradables, la contaminación de productos, corrosión de tuberías e inactivación de los catalizadores (Levent y Hanife, 2007). Además, la mayor parte de los gases son desulfurados para minimizar las emisiones nocivas a la atmósfera y los riegos laborales por exposición, lo que contribuye a incrementar el contenido de compuestos azufrados en el agua de lavado que entra a la PTAR (Planta de Tratamiento de Aguas Residuales) de la planta de refinación para su tratamiento.

---

En aguas residuales con alto contenido de bacterias desulfurantes, se ha observado que la producción de H<sub>2</sub>S generalmente se ve incrementada a causa de la reducción bacteriana de los sulfatos (Rheineimer, 1994), representado un riesgo a su entorno por la toxicidad de dicho compuesto. Debe considerarse también, que la oxidación y reducción de los compuestos azufrados para mantener el equilibrio de los ecosistemas es mediado por distintos microorganismos, por lo que la acumulación excesiva de alguna forma de azufre es suficiente para producir un desequilibrio en todo el sistema.

### ***3.3.2 Compuestos fenólicos como contaminantes del agua en refinerías petroleras.***

La importancia de los efluentes fenólicos industriales, reside en su toxicidad potencial y en las altas cantidades en las que son eventualmente descargados. El fenol, junto con los clorofenoles, el o-cresol y p-nitrofenol son sustancias tóxicas reconocidas por la OECD desde 2004 (Rubalcaba et al., 2007), debido a los efectos tóxicos de los mismos, principalmente por originar la ruptura de la membrana celular e inactivación de enzimas por desnaturalización y precipitación de proteínas.

En general, la biodegradabilidad de los compuestos fenólicos esta estrechamente relacionada con el número y el tipo de sustituyentes en su estructura; en los clorofenoles, por ejemplo, usualmente la biodegradabilidad disminuye y la toxicidad aumenta conforme aumenta el número de cloros en la molécula (Eker, 2007). Sin embargo, se ha encontrado que los tratamientos biológicos, utilizando bacterias e incluso algunos hongos, resultan en una alta eficiencia de remoción cuando los niveles de dichos compuestos son lo suficientemente bajos para no interferir con el crecimiento de los microorganismos (Kargi, 2007).

Específicamente en la industria de refinación, la mayor parte de los compuestos fenólicos llegan al efluente de residuales por el pretratamiento del crudo con sosa cáustica para remover trazas de sulfuro de hidrógeno y fenoles alquilados en etapas



previas. La mezcla originada de ésta purificación es lavada antes de ser enviada a la siguiente fase; las aguas generadas del lavado son contabilizadas al resto de residuales generadas por todo el proceso.

### 3.3.3 Compuestos nitrogenados como contaminantes del agua en refinerías petroleras

Mediante procesos fotoquímicos, el nitrógeno en la atmósfera  $N_2$  (gas) se oxida ( $NO_3$ ) o reduce ( $NH_3$ ) generando compuestos que posteriormente son arrastrados a la superficie terrestre por precipitación pluvial. Donde microorganismos fijadores de nitrógeno pueden producir derivados orgánicos a partir de ellos, permitiendo su oxidación y reducción mediante la actividad de microorganismos nitrificantes (Chapelle, 1993).

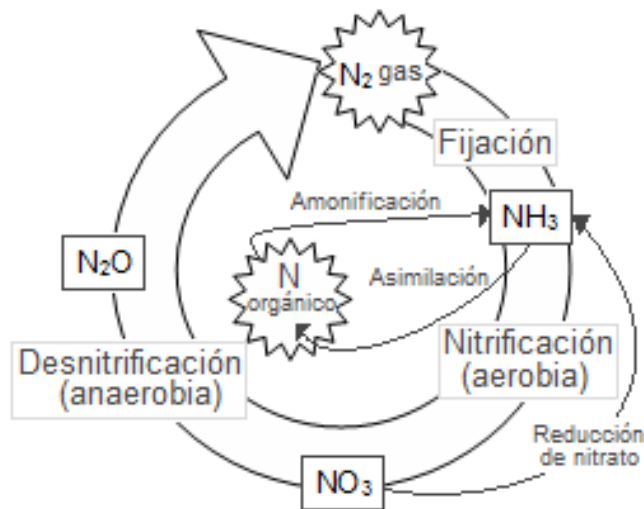


Figura 3. Ciclo del nitrógeno.  
(Tomado de Chapelle, 1993)

Bajo condiciones aerobias, el amonio es oxidado a nitritos ( $NO_2^-$ ) (*Nitrosomonas*). Después, éstos son nuevamente oxidados (*Nitrobacter*) a nitratos ( $NO_3^-$ ). Para completar la oxidación del nitrógeno, el nitrato debe ser asimilado por una variedad de microorganismos que lo incorporan a los grupos  $NH_2$  de las proteínas vía su reducción (Gregor y Milenko, 2008). Finalmente, cuando el organismo muere, el nitrógeno de

---

proteínas regresa a nitrógeno inorgánico por la reducción del nitrato (deaminación) de la manera siguiente:



En las aguas residuales de refinería, el amonio es el compuesto nitrogenado más común por el resultado de dos operaciones; la inyección de  $\text{NH}_3$  en el tope de la columna de fraccionamiento para neutralizar la potencial salida de  $\text{H}_2\text{S}$  (formando  $\text{HSNH}_4$ ) y la hidrogenación del nitrógeno orgánico cuando el crudo es refinado. Por lo tanto, en los sistemas oxigenados del tratamiento de éstas residuales, puede suceder la interrupción del ciclo del nitrógeno ya que las condiciones no son favorables para el proceso final de deaminación. Lo que se puede traducir en una acumulación de nitritos y nitratos tal, que su concentración final se encuentre fuera del rango recomendado para descargar las aguas residuales en cuerpos receptores. Se ha observado que respecto a la remoción de nitrógeno, la combinación de tratamientos aerobios y anaerobios, genera un sistema de nitrificación-denitrificación permitiendo una mayor depuración de este tipo de compuestos, llegando incluso al 100% cuando se utilizan aguas de tipo municipal (Vaiopoulou, 2007).

El nitrógeno es un nutriente clave en la naturaleza. En general, las especies nitrogenadas en aguas se encuentran como nitrógeno inorgánico disuelto (amonio, nitrito y nitrato), nitrógeno orgánico disuelto (fracciones amino de aminoácidos y péptidos), partículas orgánicas (algas, bacterias) y nitrógeno inorgánico. Pero una cantidad excesiva de cualquier tipo de estos compuestos puede generar problemas ambientales tanto de eutrofización (Campins, 2008), como al reaccionar con algunas sustancias pudiendo originar compuestos altamente tóxicos y carcinógenos como las nitrosaminas (Miranda, 2007).

### **3.4 Normatividad aplicable**

La principal norma aplicable a las aguas residuales es la NOM-001-SEMARNAT-1996, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales (Tabla 4). Misma que promete tener

---

una reforma en 2008 donde las determinaciones de la Demanda Química de Oxígeno (DQO) y Sólidos Suspendidos Totales (SST) estén incluidas como indicadores de calidad, con la finalidad de simplificar los cálculos requeridos para detectar contaminación en descargas de aguas residuales, y considerando que dichos parámetros miden de forma eficiente y representativa el grado de contaminación de un cuerpo de agua. Dentro de esta misma norma se incluyen otras de tipo nacional que abarcan todo lo referente al estudio de los contaminantes básicos y patógenos y parasitarios.

A la fecha, la refinería de PEMEX en Salamanca, se ha certificado en cuestión de calidad ambiental (ISO-14001:2004), logro significativo ya que este centro abastece a once estados del país en materia de energéticos. Con este hecho, reafirma la intención de cumplir con los requisitos ambientales legales aplicables a procesos de refinación de petróleo (PEMEX, Informe, 2007).

### **3.5 Tratamiento de aguas residuales**

La depuración de las aguas residuales se basa en una combinación de procesos que se deben aplicar en función de la calidad de agua deseada como efluente, así como, del espacio y los recursos económicos con que se cuenten en el lugar. (Luna Pabello, 2006).

Las etapas que se pueden distinguir en el tratamiento de aguas son, generalmente, cuatro: preliminares, primarias, secundarias y terciarias (Tabla 3). Con procedimientos característicos en cada una de ellas que proveen de una amplia gama de posibilidades a optimizar para mejorar la calidad del efluente final.

Cada PTAR es instalada de acuerdo al tipo de agua que es tratado en ella, es decir, el tipo de tratamiento, así como los procesos en cada uno de ellos, es seleccionado en función del origen de las residuales, los contaminantes que se desean eliminar y la calidad del efluente final deseado, en cumplimiento con la normatividad aplicable.

**Tabla 3. Etapas generales en el tratamiento de aguas residuales.**

<b>Tratamiento</b>	<b>Propósito</b>	<b>Número de Plantas*</b>
Preliminar	Destinado a la eliminación de residuos fácilmente separables (arenas, grasas, etc.) y en algunos casos un procesos de pre-aireación.	NE
Primario	Eliminación de sólidos de gran tamaño, fácilmente sedimentables y con densidades menores a la del agua. Se utilizan mallas, sedimentadores, decantadores y filtros. No elimina contaminantes disueltos pero evita una posible incorporación posterior por disolución.	725
Secundario	Eliminación de material orgánico disuelto biodegradable mediante procesos biológicos aerobios y anaerobios que originan sólidos biológicos que pueden separarse por procedimientos físicos. Dichos procesos incluyen reactores anaerobios, de lecho empacado, biológicos rotatorios, secuenciales de alimentación por lote, lagunas facultativas, lagunas aerobias, lodos activados, filtros percoladores y humedales artificiales entre otros.	1047
Terciario	Mejorar la calidad del agua lograda en los procesos anteriores mediante la reducción final de metales pesados y/o contaminantes químicos específicos así como la eliminación de patógenos y parásitos. Es posible la remoción de material orgánico no biodegradable o de difícil biodegradación. Se incluyen los procesos de filtración, adsorción, cloración, coagulación, ósmosis inversa, ultrafiltración e intercambio iónico.	71

\*FUENTE: CONAGUA, Subdirección General Técnica, 2006.

NE: No especificado

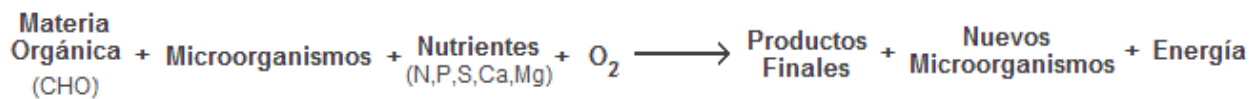
De la tabla anterior se puede observar que el tipo de tratamiento permite clasificar claramente las etapas que intervienen en el proceso de depuración de agua. Sin embargo, una PTAR comprende una diversidad de configuraciones que permiten generar mayores eficiencias así como mejoras en los sistemas. Por ejemplo, parte de las aguas residuales generadas pueden ser sometidas a tratamientos específicos con la finalidad de disminuir los impactos tóxicos de los contaminantes sobre la microbiota antes de entrar al tratamiento biológico para mantener la eficiencia del proceso (Coelho, 2006).

---

### 3.5.1 Sistemas de tratamiento biológicos de aguas residuales

Los procesos biológicos pueden clasificarse en función del aceptor final de electrones presente en el líquido bajo tratamiento en procesos anaerobios, aerobios y aerobios facultativos. Los procesos anaerobios no requieren de oxígeno molecular libre en solución, ya que los aceptores de electrones son compuestos inorgánicos. Por el contrario, los procesos aerobios requieren mínimo 2mg/L de oxígeno molecular libre en solución, mientras que los facultativos consisten en la combinación de los dos procesos anteriores (Luna Pabello, 2006).

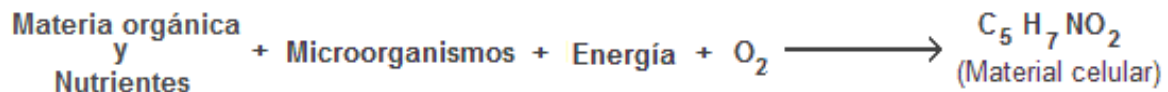
La oxidación biológica es el mecanismo que define a los “Procesos Biológicos Aerobios”, de acuerdo a la siguiente reacción:



(Tomado de Miranda, 2007)

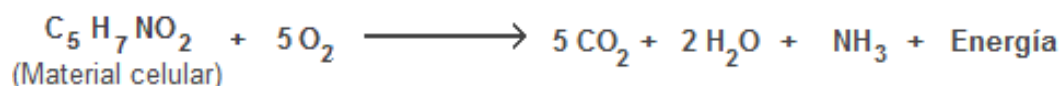
Este proceso como tal es el acoplamiento de dos reacciones fundamentales:

1) *Reacciones de síntesis o asimilación: Incorporación de nutrientes para formación de nuevos microorganismos.*



(Tomado de Miranda, 2007)

2) *Respiración endógena u oxidación: Transformación de materia orgánica y nutrientes para obtención en energía vital.*



(Tomado de Miranda, 2007)

---

Las reacciones biológicas dependen principalmente de dos factores: las características del sustrato (cantidad y tipo de materia orgánica) y condiciones ambientales (temperatura, aireación, inhibidores, pH). Por lo que en el desarrollo de métodos para el estudio de los procesos de biodegradación, la cuantificación e identificación de la materia orgánica contenida en las muestras así como el establecimiento de las condiciones adecuadas son los puntos clave para obtener procesos de remoción eficientes (Berthea et al., 2007).

Además de dichos factores, también existen otros de naturaleza biológica, que producen efectos en el proceso biológico, ejemplo de estos son las relaciones de intercambio entre los diversos miembros de las comunidades microbianas (competencia por el sustrato, metabiosis) hasta el punto de favorecer o inhibir el desarrollo entre si, dando lugar a fluctuaciones frecuentes y amplias en el número y tipo de microorganismos presentes en un sistema a lo largo del tiempo, y a menudo evitando la acumulación de productos tóxicos del metabolismo (Rheineimer, 1994).

El efecto de los factores fisicoquímicos y biológicos no es independiente uno de otro, por el contrario, desplazamientos de pH, presiones osmóticas altas, exceso de compuestos azufrados o nitrogenados o cualquier cambio en los factores abióticos del medio implica el desarrollo de organismos generalmente especializados cuyos productos metabólicos, cada vez más abundantes, pueden provocar la inhibición de algunos de los microorganismos participantes e incluso, la exclusión total de una parte de ellos.

### ***3.5.2 Tratamiento Biológico del Agua Residual de Refinerías de Petróleo.***

Hoy en día se reconoce que las actividades de los microorganismos en las aguas contribuyen de manera decisiva a la auto-depuración de estas por la descomposición de sustancias orgánicas contaminantes. Con base en la reducción de la concentración de materias nutritivas orgánicas, los sistemas biológicos, aerobios y anaerobios, son actualmente una alternativa para clarificar las residuales, relacionando la microbiota

---

intrínsecamente en la productividad de estos sistemas a través de su participación en el flujo de energía y en el ciclo de materiales (Mitchell, 1993). Considerando que la oxidación biológica de los efluentes en las plantas de refinación de petróleo son usualmente el método más económico que además disminuye toxicidad (Tyagi, 1992).

En el informe de Seguridad y Protección Ambiental de PEMEX en 2007, estableció que, dentro de su estrategia de desarrollo ambiental, tiene como desafío hacer compatible la producción de los recursos petroleros con la conservación y restauración del entorno natural y de los recursos aledaños a las comunidades donde opera, impactando positivamente a la regeneración de recursos naturales.

Particularmente, en la Refinería de Salamanca, se han realizado acciones tales como: instalación de cubiertas flotantes en los cárcamos colectores de aguas urbanas, rehabilitación y modernización del sistema de filtración primaria para la reducción de sólidos, tratamiento de lodos activados y uso en torres de enfriamiento, además de la puesta en marcha de equipo de flotación de aire entre el tratamiento primario y secundario de efluentes (PEMEX, Informe 2007).

## **3.6 Biodegradabilidad**

### ***3.6.1 Conceptos generales***

Se denomina biodegradación a la descomposición de la materia orgánica natural o sintética causada por la acción de los microorganismos para la obtención de moléculas más simples. Por lo tanto, la biodegradabilidad sería la capacidad de una sustancia para transformarse en compuestos más sencillos por acción de los microorganismos (Ambriz, 1998); dicha biotransformación implica la perfecta armonía entre las reacciones de asimilación y síntesis.

Biodegradación aerobia: es la degradación biológica que se lleva a cabo en ambientes con al menos 2mg de oxígeno libre molecular por litro. Los principales productos son dióxido de carbono, agua y biomasa microbiana.

---

Biodegradación anaerobia: se lleva a cabo en ambientes cuya concentración de oxígeno es muy baja o inexistente. Se promueve el crecimiento de bacterias anaerobias, especialmente metanógenas (originan metano y dióxido de carbono a partir de la materia orgánica soluble). Desde el punto de vista metabólico, se considera ineficiente ya que los microorganismos dejan grandes cantidades de material orgánico parcialmente digerido en forma de ácidos grasos, alcoholes y otros similares.

Los ambientes contaminados muy rara vez presentan un solo tipo de contaminante orgánico, por consiguiente, la velocidad de biodegradación de compuestos orgánicos puede ser variable en función de la concentración de nutrientes inorgánicos indispensables, cantidad de oxígeno disponible, temperatura, competencia, entre otros.

Las desventajas y dificultades técnicas de estos procesos son:

- Limitación en las velocidades de degradación, que dependen de la naturaleza del contaminante.
- Solubilidad en fase acuosa y biodisponibilidad.
- Efectividad de los microorganismos involucrados.
- Carácter recalcitrante del compuesto, determinado por sus propiedades fisicoquímicas (Ambriz, 1998) muchos de los cuales son biodegradables apreciablemente sólo bajo condiciones anaerobias (Mohamed, 2006).

Sin embargo, el éxito de éste tipo de alternativas depende del conocimiento de las condiciones óptimas de crecimiento y biodegradación para cada tipo de contaminante, así como de las características particulares del sitio contaminado (Ambriz, 1998).

Cabe recordar que el consumo de oxígeno disuelto a partir de la respiración microbiana constituye una medida indirecta de la cantidad de materia orgánica biodegradada, considerando que un mg de oxígeno disuelto consumido durante la prueba es igual a un mg de materia orgánica biodegradada. (APHA, 1998)



---

La cantidad de oxígeno molecular teóricamente requerido para la completa oxidación de los compuestos es la demanda teórica de oxígeno (DTO), la cual puede ser calculada a partir de la siguiente fórmula química:

$$DTO = \frac{16 [ 2C + 0.5 ( H + Cl + 3N ) - O ]}{PM}$$

Donde:

- C = número de átomos de carbono
- H = número de átomos de hidrogeno
- O = número de átomos de oxígeno
- N = número de átomos de nitrógeno
- Cl = número de átomos de cloro
- PM = peso molecular.

El carbono orgánico disuelto (DQO) puede sustituir a la DTO cuando no se conoce la estructura química de la sustancia o cuando la muestra en estudio es una mezcla de sustancias.

Eckenfelder y Grau, 1992, (Mohamed, 2006) establecieron la biodegradación aerobia de algunos compuestos orgánicos, proponiendo la siguiente clasificación de acuerdo a la relación de la demanda bioquímica de oxígeno y la demanda total de oxígeno en una muestra dada.

Tabla 4. Biodegradabilidad de acuerdo a la relación DBO<sub>5</sub>/DQO

Relación DBO <sub>5</sub> /DQO	Clasificación
> 50 %	Rápidamente Biodegradable
25 – 50 %	Moderadamente Biodegradable
10 – 25 %	Ligeramente biodegradable
< 10 %	Recalcitrante

---

### **3.6.2 Prueba de Biodegradabilidad Aerobia Rápida OECD 301 A.**

Las pruebas de biodegradabilidad, fueron desarrolladas por agencias reguladoras internacionales con la finalidad de evaluar la facilidad con la cual un compuesto es propenso a ser degradado por los microorganismos presentes en el medio y cuantificar la remoción del contaminante llevada a cabo por los procesos metabólicos microbianos (Vázquez et al., 2007).

La prueba de biodegradabilidad aerobia rápida (OECD, 1992), es comúnmente usada para obtener una primera caracterización de los compuestos orgánicos en una muestra en términos de su accesibilidad para ser degradada por microorganismos (Stasinakis et al., 2008)

El inóculo microbiano es un parámetro poco controlado en estas pruebas. Aunque en los protocolos de la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico (OECD) se establece un máximo de 30mg SST/L, hace falta la regulación del origen y pretratamiento de éste ya que, en general, el preacondicionamiento del inóculo sólo incluye operaciones físicas (decantación, filtración, centrifugación), periodos de aireación y/o el precultivo del inóculo. Cuya intención es principalmente eliminar el carbono exógeno y partículas gruesas, y para la obtención de densidades celulares adecuadas por dilución o concentración del mismo (Vázquez et al., 2007) pero no la caracterización completa del consorcio de microorganismos.

## **3.7 Toxicidad aguda**

### **3.7.1 Aspectos generales**

Un tóxico se considera como cualquier agente capaz de producir una respuesta adversa en un sistema biológico, sean éstos formas de energía como calor y radiaciones, toxinas y vegetales o productos sintéticos como medicamentos y plaguicidas (SEMARNAT, 2007). Sin embargo, se debe recordar que Paracelso (1493-

---

1541 años d. C.) postuló que “todas las sustancias pueden ser venenos, su dosificación hace la diferencia para que se comporte como un veneno o un remedio”, por lo que la relación dosis-respuesta, entre otras características, se debe tomar en cuenta para definir la toxicidad de un compuesto dado.

La toxicidad de una sustancia determinada se ha clasificado de diversas formas para facilitar el estudio de la misma. Una de ellas es de acuerdo al tiempo de exposición que un ser vivo permanece en contacto con el compuesto en estudio, estableciendo 4 tipos de toxicidad: aguda, una sola exposición o periodos de exposición cortos; subaguda, tiempo de exposición menor a 1 mes; subcrónica, de 1 a 3 meses de exposición y crónica, tiempo de exposición mayor a 3 meses. Considerando que para cualquier tipo de toxicidad la frecuencia de exposición es un dato esencial para realizar un estudio toxicológico completo (Hodgson, 2004; Williams, 1985).

La toxicidad aguda es comúnmente asociada con accidentes o imprudencia durante el uso de uno o más compuestos. La imposición de límites para la descarga de contaminantes a diversos cuerpos receptores ha sido una medida, en general, exitosa para disminuir la toxicidad aguda de los diversos compuestos sobre los organismos vivos. En general, este tipo de toxicidad es determinada experimentalmente con especies seleccionadas que sirven como representantes de niveles tróficos particulares en un ecosistema. Por ejemplo: mamíferos, aves, peces, invertebrados, plantas, algas, ciliados, entre otros. Utilizando como fundamento, el hecho de que cualquier alteración en alguno de los niveles tiene consecuencias sobre el resto del ecosistema. La característica de una sustancia o mezcla de sustancias de ocasionar un desequilibrio ecológico se conoce como toxicidad ambiental (NOM-052-SEMARNAT-2005), mientras que los efectos de los contaminantes ambientales sobre los ecosistemas y sus componentes se conoce como ecotoxicidad (Hodgson, 2004).

Cuando se utilizan microorganismos durante una evaluación toxicológica, la interacción entre los contaminantes y la microbiota puede ser clave para realizar un ensayo toxicológico considerando que los contaminantes pueden afectar la actividad microbiana mediante efectos de estimulación o inhibición, dependiendo de la forma y

---

concentración del contaminante. Si los contaminantes son tóxicos o presentan una toxicidad crónica para la población microbiana o parte de ella, esto producirá alteraciones en las vías metabólicas normales, en el flujo de energía y en la productividad del sistema.

La microbiota puede afectar el destino de muchos contaminantes por su contribución a la remoción a través de la absorción, degradación (para contaminantes orgánicos) o transformación (para metales). De cualquier forma, una toxicidad excesiva puede afectar la capacidad de un sistema particular para detoxificarse mediante la actividad microbiana (Mitchell, 1993).

### ***3.7.2 Ensayos de toxicidad aguda por contacto***

Por las características peculiares de los protozoos, así como la ventaja económica en tiempo y costo que representan, se han desarrollado pruebas de contacto para detectar la presencia de compuestos inhibidores o sustancias tóxicas en un medio dado; con el fundamento de que, en ausencia de pared celular u alguna otra estructura similar en la célula, cualquier sustancia en disolución se encuentra directamente en contacto con el protozoo. Por lo anterior, existen numerosos trabajos relacionados con el uso de éstos microorganismos como indicadores de calidad y/o concentración de contaminantes en aguas (Luna Pabello, 2006).

Se acepta a los protozoos como organismos unicelulares, que no forman órganos, ni tejidos, ni presentan desarrollo embrionario. Su tamaño oscila de 10 micras a 4mm pudiendo ser solitarios o coloniales. Se encuentran en ambientes tanto acuáticos como terrestres y aéreos, pero preferentemente en aquellos lugares donde existe humeado o por lo menos una película de agua. De entre ellos, los ciliados son de los más grandes y reciben su nombre debido a la presencia de numerosas estructuras llamadas cilios. La amplia distribución de los ciliados así como su abundancia se debe a su gran tolerancia y adaptabilidad a amplios rangos de condiciones ambientales. Estas características son la que relacionan el desarrollo de los

---

organismos en un determinado ambiente acuático con la calidad fisicoquímica prevaleciente en ese medio.

### **3.7.3 Plantas terrestres, prueba de crecimiento OECD 208**

El procedimiento OECD 208 “Terrestrial plants, growth test” (Plantas terrestres, prueba de crecimiento), se estableció con la finalidad de evaluar los efectos potenciales de diferentes sustancias (puras o en mezcla) sobre el crecimiento y germinación de alrededor de 52 especies de plantas terrestres. La lechuga (*Lactuca sativa L.*), se incluye dentro de las especies vegetales establecidas para evaluación de toxicidad.

El bioensayo permite evaluar los efectos fitotóxicos de la sustancia de prueba sobre el proceso de germinación de las semillas y en el desarrollo de las plántulas durante los primeros días de crecimiento respecto a un tóxico de referencia o control positivo. Por lo tanto, no arroja datos acerca de los posibles efectos crónicos como son formación de flores, maduración de frutos, etc. Sin embargo, para la finalidad de éste trabajo, la información que dicho estudio proporciona es de utilidad considerando que la sustancia de prueba no permanece en contacto con la microbiota durante un periodo mayor a 3 meses (OECD 208, 1993. Ver Capítulo 4).

---

## CAPÍTULO 4.

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 4.1 Muestra

El presente trabajo se realizó utilizando como muestra agua residual proveniente de la refinería de Petróleos Mexicanos (PEMEX) “Ing. Antonio M. Amor”, ubicada en Salamanca, Guanajuato (Figura 5).

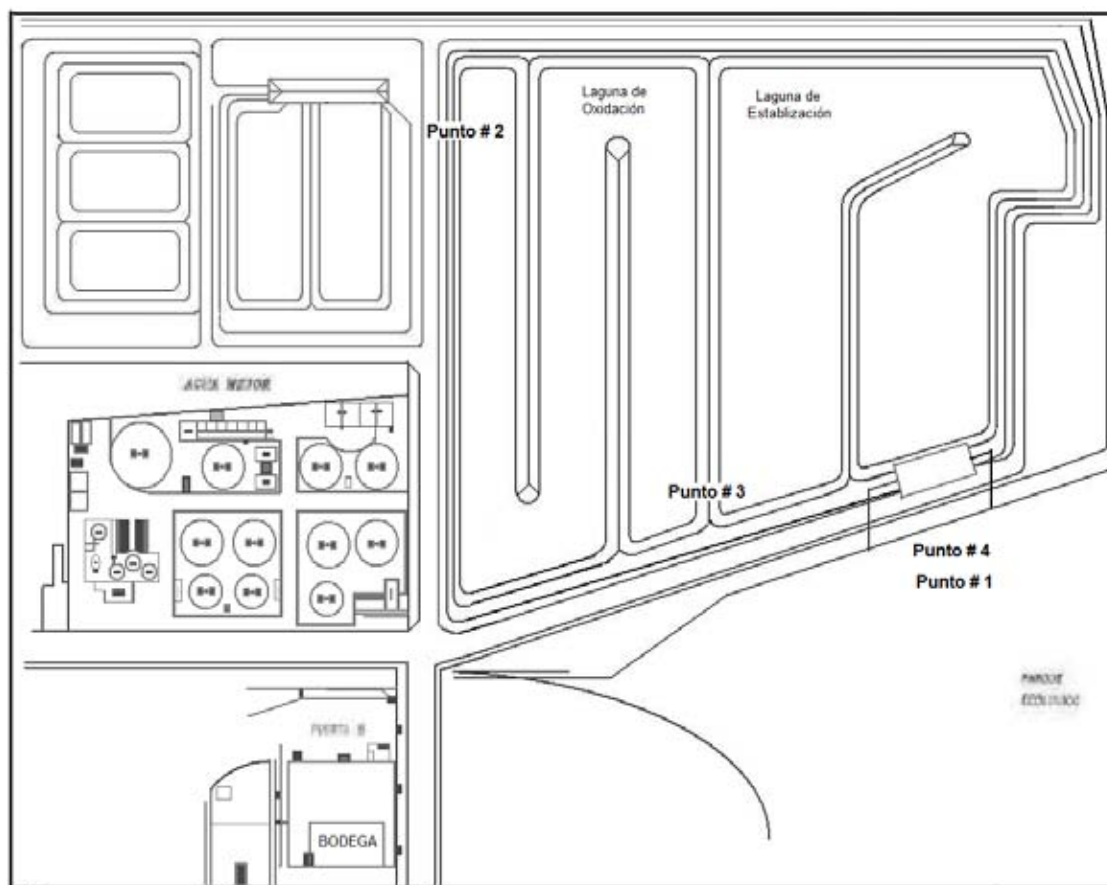


Figura 1. Plano correspondiente a la PTAR de la refinería Antonio M. Amor de PEMEX en Salamanca, Guanajuato.

El muestreo se realizó, por personal capacitado, en una sola toma del influente correspondiente a la laguna de oxidación de la planta de tratamiento de agua (PTAR) con la que cuenta la refinería mencionada.



Figura 2. Fotografías tomadas en la zona de muestreo. 1) Hiperaireadores en laguna de oxidación. 2) Aireadores mecánicos en laguna de oxidación. 3) Punto de muestra 2, influente a laguna de oxidación.

Dicha muestra se dividió y conservó de acuerdo a lo establecido en cada uno de los protocolos a realizar. Tomando en cuenta el tiempo máximo de almacenamiento para dar prioridad a determinaciones tales como la demanda bioquímica de oxígeno ( $DBO_5$ ), que, por sus particularidades, requieren ser evaluadas en las primeras 24 horas a partir de que se tomó la muestra. Previo a cada estudio, la muestra fue centrifugada a 2500rpm durante 15 minutos y posteriormente filtrada utilizando papel filtro Whatman No. 1 con la finalidad de evitar interferencias por la materia orgánica no disuelta en la muestra.

## 4.2 Reactivos

El grado de pureza y la preparación de todos los reactivos y soluciones utilizadas para cada ensayo del estudio, concuerdan con lo especificado en cada uno de los protocolos utilizados para la determinación de los diferentes parámetros evaluados.

## 4.3 Inóculo

Como inóculo, se utilizaron lodos activados provenientes de la planta de tratamiento de aguas residuales (PTAR) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM, México D.F.). Dicho consorcio de microorganismos, fue aclimatado para ser utilizado como inóculo durante 5 días en completa oscuridad,  $28^{\circ}\text{C}$  y en aireación constante mayor a  $2\text{mg/L}$ .

Fue caracterizado microbiológicamente mediante observación microscópica, tinción Gram y determinación del número más probable de coliformes totales de acuerdo a la norma mexicana NMX-AA-042-1987 (ANEXO I).

Finalmente, con base en la norma mexicana NMX-AA-034-SCFI-2001 referida en la NOM-001-SEMARNAT-1996, se determinó la cantidad de sólidos suspendidos totales (SST) contenidos por cada litro de inóculo de acuerdo al diagrama siguiente:

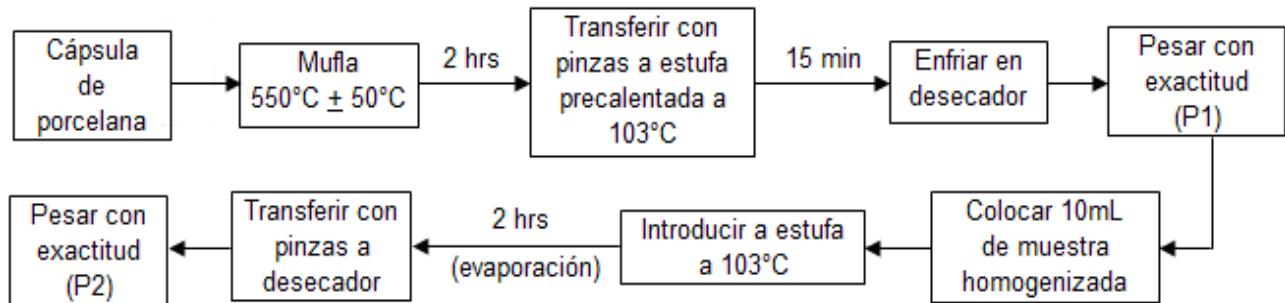


Figura 3. Diagrama de procedimiento para obtener la cantidad de sólidos suspendidos totales en el inóculo.

La cantidad de SST se obtiene aplicando la siguiente ecuación (1):

$$\text{Ecuación 1} \quad \text{mg SST/L} = \frac{\text{P2 (g)} - \text{P1 (g)}}{\text{Vol Muestra (mL)}} \times 10^6$$

Donde **P1** corresponde al peso de la cápsula seca sin muestra y **P2** es el peso de la cápsula con una cantidad establecida de muestra seca.

#### 4.4 Reactor y condiciones de operación

##### *Montaje del reactor*

Mediante la previa determinación de sólidos suspendidos totales (SST) en el inóculo (Figura 4), se realizó el siguiente cálculo (Ecuación 2) para mantener una concentración de 800mg SST/L en el reactor aerobio a utilizar:



---

Ecuación 2

$$\text{Vol de Inóculo (mL)} = \frac{(800 \text{ mg SST/L}) (4000 \text{ mL})}{\text{mg SST/L calculados}}$$

De acuerdo a la fórmula anterior, y considerando un volumen de muestra de 4000mL, se obtiene el volumen necesario de lodos activados que se requiere adicionar a la columna para obtener una concentración final de 800 mg de sólidos totales por cada litro de muestra.

El reactor se mantuvo dentro de un cuarto de incubación, en completa oscuridad y a una temperatura constante de 28°C. La aireación fue constante y superior a 2mg O<sub>2</sub>/L

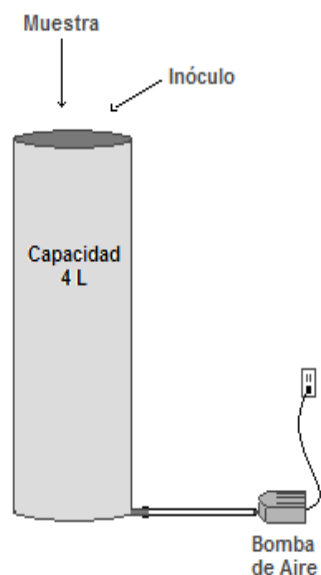


Figura 4. Esquema del reactor aerobio de flujo cerrado empleado.

### Muestreo

Se obtuvieron 5 muestras por semana para obtener una curva adecuada del porcentaje de remoción de DQO. La muestra fue centrifugada a 2500rpm y posteriormente filtrada mediante el uso de papel filtro Whatman No. 1, con la finalidad de eliminar interferencias provenientes del inóculo y la muestra en la determinación correcta de la DQO (ANEXO C). Debido al alto nivel de DQO en estas muestras y la sensibilidad del método, fue necesario realizar una dilución 1:50 de cada una de las muestras tomadas del reactor.

---

## 4.5 Prueba de biodegradabilidad

La degradación biológica aerobia de la muestra se determinó mediante la aplicación de la OECD 301 A “Prueba de Biodegradabilidad Aerobia Rápida” (ANEXO A). Para su montaje, fue necesario utilizar el valor inicial de DQO medido durante la caracterización de la muestra original y calcular la alícuota necesaria para que cada uno de los respectivos matraces, contuviera 40 miligramos de oxígeno por litro. Se calculó también la respectiva alícuota de lodos activados para obtener una concentración máxima de 30 mg/L de Sólidos Suspendidos Totales en cada matraz a inocular (Ecuación 3). La preparación de los controles, la temperatura, aireación, pH y muestreo se llevó a cabo de acuerdo a lo establecido en la prueba antes mencionada.

$$\text{Ecuación 3} \quad \text{Vol de Inóculo (mL)} = \frac{(30 \text{ mg SST/L})(1000 \text{ mL})}{\text{mg SST/L calculados}}$$

La biodegradabilidad fue establecida utilizando como parámetro indicador la DQO, por lo que durante los 28 días de prueba, cada muestra fue centrifugada a 2500rpm y posteriormente filtrada utilizando papel Whatman No. 1 para evitar interferencias de la materia orgánica no disuelta. La sensibilidad del método permitió determinar adecuadamente el contenido de DQO en cada matraza, por lo que no fue necesario realizar diluciones a las muestras.

## 4.6 Prueba de toxicidad aguda por contacto empleando al ciliado *Colpoda cucullus*.

Para predecir el nivel de toxicidad de la muestra en estudio se realizó una prueba de contacto con el protozoo *Colpoda cucullus*. Como indicador de toxicidad, aplicando la solución de prueba al 100% sobre 10 microorganismos y realizando la observación microscópica a intervalos de 3 minutos durante 15 minutos para detectar disminución de movilidad o muerte (ANEXO B). Los resultados obtenidos de ésta prueba serán el fundamento para seleccionar el rango de concentraciones adecuado a utilizar en la prueba de toxicidad aguda OECD 208 utilizando semillas de lechuga.

## 4.7 Prueba de Toxicidad aguda empleando *Lactuca sativa* L.

La prueba formal de toxicidad aguda se realizó mediante la aplicación de la prueba de toxicidad aguda “Evaluación de la inhibición del crecimiento en plantas terrestres” (ANEXO B) utilizando semillas de lechuga, en la que el porcentaje de germinación y el desarrollo de las plántulas durante los primeros días de crecimiento, son considerados como indicadores confiables de toxicidad.

La metodología general utilizada al aplicar esta prueba se ilustra a continuación.

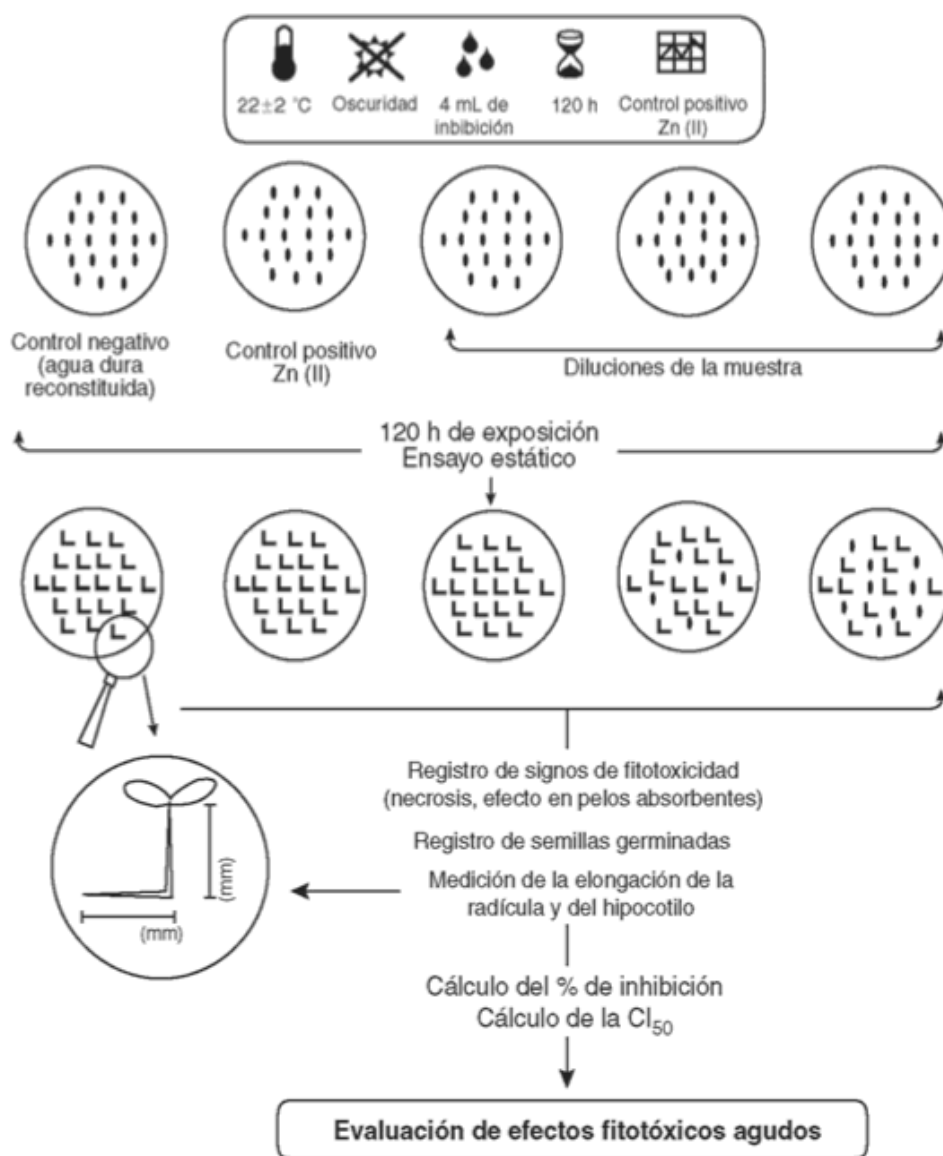


Figura 5. Esquema general del procedimiento de la prueba de toxicidad aguda.

---

Para tal estudio, se utilizaron semillas estandarizadas de lechuga (*Lactuca sativa* L.), se manejaron concentraciones de 100, 50 y 1% de la muestra diluida con agua dura reconstituida, 1mg de ZnSO<sub>4</sub>/mL como control negativo (Abner, 2007) y un control positivo que consistió en agua de dilución. La prueba se realizó en una incubadora cerrada a una temperatura constante de 22 ± 2°C durante 120 h. Se consideraron 20 semillas por réplica y el número de réplicas fueron 3. Al evaluar la toxicidad aguda de las aguas residuales se compararon las dimensiones obtenidas contra el blanco negativo como las máximas con un 0% de toxicidad y contra el blanco positivo como el 100% de toxicidad. El porcentaje de inhibición se midió con el grado de inhibición en la germinación o en la elongación de la radícula e hipocotilo (ANEXO B).

## **4.8 Técnicas y equipos utilizados para la caracterización de la muestra**

### ***4.8.1 Caracterización fisicoquímica***

#### *Determinación de pH*

En todas las ocasiones necesarias, la concentración de protones en el medio se determinó utilizando un potenciómetro OKTON® (pH, mV, °C meter).

#### *Determinación de DBO<sub>5</sub>*

La demanda bioquímica de oxígeno se midió utilizando el método yodométrico, también llamado de azida de sodio, incluido en la norma mexicana NMX-AA-028-1981 (ANEXO H).

#### *Determinación de DQO*

La DQO se realizó utilizando el método de reflujo cerrado (micrométodo) indicado en la guía OECD 301 A para la prueba de biodegradabilidad aerobia rápida (ANEXO C), realizando las diluciones necesarias cuando la muestra lo requirió.

---

#### *Determinación de Fenoles*

La cantidad de fenoles en las muestras se midió utilizando como referencia la norma mexicana NMX-AA-050-SCFI-200 (ANEXO D).

#### *Determinación de Nitrógeno total*

El Nitrógeno se determinó de manera total mediante el método Semi-micro-Kjeldahl, utilizando como referencia la norma mexicana NMX-AA-026-1980 (ANEXO E).

#### *Determinación de Sulfatos*

El ión sulfato fue determinado de acuerdo a la metodología incluida en la norma mexicana NMX-AA-074-1981 (ANEXO F), utilizando el método turbidimétrico y haciendo uso del espectrofotómetro UV/VIS Pharma Biotech Ultrospect 3000®.

#### *Determinación de Sulfuros*

La determinación de sulfuros se realizó por el método iodométrico incluido en la norma mexicana NMX-AA-084-1982 (ANEXO G).

### **4.8.2 Caracterización microbiológica**

#### *Observación microscópica*

Se realizó la observación microscópica del inóculo a 40X y 100X de los ciliados y bacterias, respectivamente, obteniendo imágenes de éstos mediante el uso de una cámara digital fotográfica Moticam 480 MOTIC® acoplada a una computadora.

#### *Determinación del NMP*

El número más probable de coliformes fue determinado utilizando el método de tubos múltiples de fermentación en serie de 3 tubos, indicado en la NMX-AA-042-1987 (ANEXO I).

---

## CAPÍTULO 5.

### PRIMERA ETAPA EXPERIMENTAL

Con el objetivo de determinar el tiempo de tratamiento biológico requerido para abatir los contaminantes presentes en la muestra a niveles deseados, se montó un reactor aerobio del mismo tipo, con la misma muestra, inóculo y condiciones de aireación y temperatura que se utilizarían para la segunda etapa experimental. De éste primer reactor, se realizó un muestreo continuo, determinando la demanda química de oxígeno (DQO) a diferentes tiempos. Con lo que se construyó una curva de remoción de la DQO para, a partir de ésta, determinar el tiempo mínimo y máximo de tratamiento en el reactor.

Se realizó también la caracterización fisicoquímica y microbiológica de la muestra, dando prioridad a determinaciones tales como la  $DBO_5$  que, por el tiempo crítico de almacenamiento de muestra, requería ser medida durante las primeras 24 horas a partir de la toma de muestra. Además, se llevaron a cabo otras determinaciones necesarias y complementarias tales como la medición de pH y obtención de los SST (sólidos suspendidos totales) en el inóculo del primer reactor.

#### 5.1 Análisis y discusión de resultados

##### 5.1.1 Caracterización Fisicoquímica

Tabla 1. Caracterización de la muestra inicial.

Parámetro	Resultado
$DBO_5$	8279 mg/L
DQO	14 400 mg/L
pH	8.58
Fenoles	74.0 mg/L
Sulfatos	123.8 mg/L
Sulfuros	40.9 mg/L
Nitrógeno total	68.4 mg/L

$$\text{Relación } DBO_5/DQO = 0.57$$

---

Los resultados obtenidos al realizar la caracterización fisicoquímica (Tabla 5) indican niveles elevados para todos los parámetros seleccionados como indicadores de contaminación. Sin embargo, son congruentes con el proceso del cual se origina la muestra. En el caso de los compuestos azufrados (sulfatos y sulfuros), se debe tomar en cuenta que la refinación de petróleo involucra procesos de desulfuración en los que interviene el agua que llega a la PTAR de ésta industria (Grant, 1993).

Se ha documentado que el agua residual proveniente de la refinación de crudo es una mezcla compleja de diferentes sustancias como aceites, fenoles, mercaptanos y amonio (Coelho, 2006), además de los derivados de azufre ya mencionados, lo que explica la presencia de compuestos fenólicos y nitrogenados en la muestra estudiada.

A pesar de que los parámetros de DQO y  $DBO_5$  de manera individual, considerados como indicadores confiables de contaminación, pueden proveer de un panorama general acerca de la calidad del agua, la relación que existe entre ellos como  $DBO_5/DQO$  proporciona una idea clara de la posibilidad de tratar una muestra mediante procesos biológicos. El resultado obtenido para ésta relación fue de 0.57, lo que, de acuerdo a Eckenfelder y Grau (Mohamed, 2006), permite predecir que la muestra en estudio es rápidamente biodegradable.

La confirmación de lo anterior se realizó mediante la aplicación de una prueba de biodegradabilidad estándar, utilizando el procedimiento OECD 301 A (Prueba de Biodegradabilidad Aerobia Rápida) reconocido internacionalmente.

Se debe mencionar que la determinación de la DQO aún no forma parte de los parámetros establecidos en la NOM-001-SEMARNAT-1996 para evaluar el grado de contaminación de un cuerpo de agua, sin embargo, su determinación es crítica para la interpretación de resultados del oxígeno disuelto y materia orgánica, así como para el montaje adecuado de la prueba de biodegradabilidad y del reactor utilizado.

---

### **5.1.2 Caracterización Microbiológica de la Muestra.**

#### *Determinación del número más probable (NMP)*

El NMP de coliformes totales se obtuvo mediante el uso de la tabla estadística correspondiente a 3 tubos incluida en la norma mencionada. Considerando como positivos (+) aquellos tubos que después de 48h de incubación presentaron turbiedad y presencia de gas de acuerdo a la NMX-AA-042-1987.

Tabla 2. Análisis microbiológico del agua de refinería.

<b>Volumen de Muestra (mL)</b>	<b>Tubo 1</b>	<b>Tubo 2</b>	<b>Tubo 3</b>
10.0	+	+	+
1.0	+	+	-
0.1	-	-	-
<b>NMP = 93</b> bacterias coliformes /100mL muestra de agua residual.			

La presencia de bacterias coliformes en una muestra cualquiera se considera como indicio de contaminación fecal. Sin embargo, se debe considerar que el agua residual que entra a la PTAR de la refinería es una mezcla de aguas procedentes del proceso de refinación como tal y también de aquellas procedentes de las actividades humanas dentro de la misma industria, lo que explica la presencia de una cantidad representativa de materia orgánica disuelta así como la presencia de microorganismos de tipo coliformes fecales en cantidades considerables. Lo anterior, contribuye de igual forma al valor medido de DBO<sub>5</sub>.

### **5.1.3 Determinación del tiempo total de tratamiento.**

La depuración de la muestra se monitorea mediante la determinación de la demanda química de oxígeno (DQO) siguiendo la metodología indicada en el ANEXO C, utilizando dos reactores, realizando la determinación del parámetro en estudio por duplicado y con una dilución 1:50 para cada muestra de acuerdo a la sensibilidad del método.



Tabla 3. Remoción acumulada de DQO en el reactor aerobio.

Tiempo (días)	DQO (mg O <sub>2</sub> /L)	REMOCION (%)	Tiempo (días)	DQO (mg O <sub>2</sub> /L)	REMOCION (%)
0	19206	0	16	8376	56.4
1	18779	2.2	17	7596	60.4
2	18352	4.4	20	6096	68.3
3	12804	33.3	21	6252	67.4
6	13658	28.9	22	4448	76.8
7	12804	33.3	23	3802	80.2
8	12377	35.5	24	3802	80.2
9	12804	33.5	27	3379	82.4
10	9552	50.3	28	3801	80.2
13	11542	39.9	29	3801	80.2
14	7957	58.6	30	3801	80.2
15	9214	52			

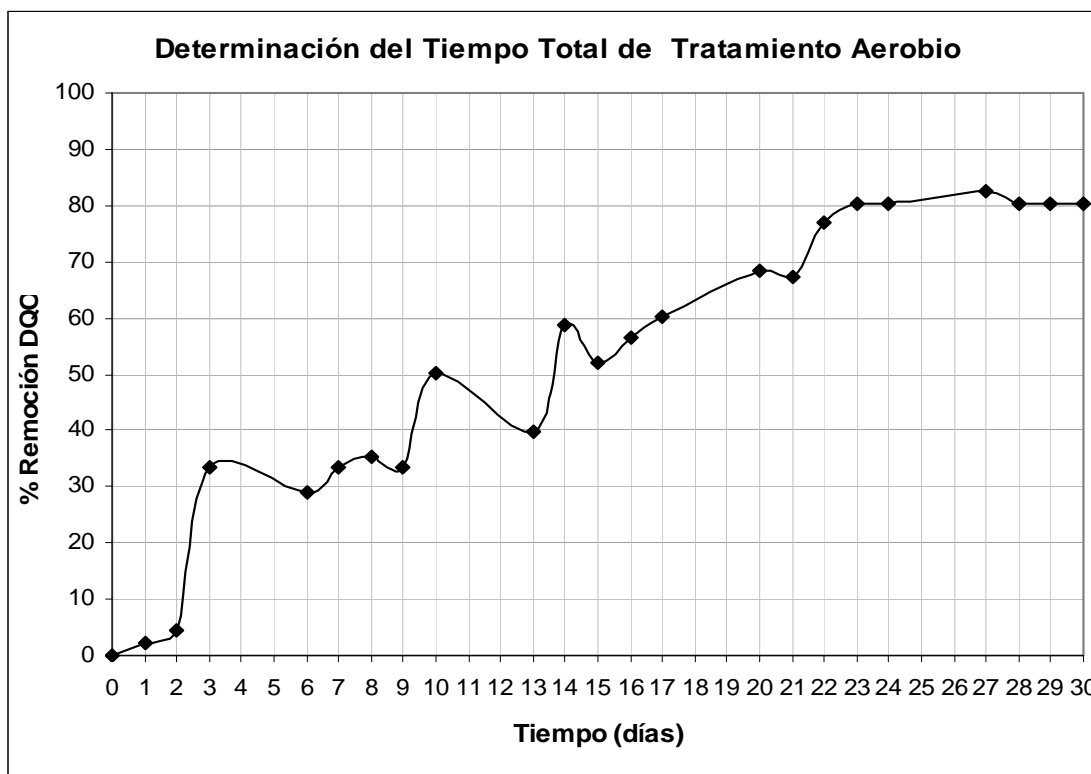


Figura 1. Gráfica de datos obtenidos para determinar el tiempo total de tratamiento.

En el gráfico anterior, se observa una tendencia ascendente del porcentaje de remoción medido de DQO, sin embargo, también se detecta la dispersión de algunos puntos en la curva que se atribuyen a la manipulación de cada muestra por parte del analista. Las variaciones en los valores medidos entre los días 20, 21 y 22 son

---

marcadas. Por lo tanto, como medida práctica, se decidió considerar el punto del día 22 para establecerlo como el tiempo mínimo de residencia hidráulica necesario para que la remoción sea de por lo menos un 70%, considerando tal porcentaje como una depuración de materia orgánica disuelta adecuada.

De acuerdo a la curva obtenida, el proceso de degradación biológica se lleva a cabo de manera continua hasta llegar a un máximo de 80% de remoción al día 23 que se mantiene constante hasta el día 30. Indicio de que la materia orgánica restante en el medio es químicamente oxidable pero no es fácilmente asimilable por los microorganismos del medio.

Es importante mencionar que, aún cuando el tiempo mínimo de tratamiento se fijó en 22 días, la duración total se estableció en 30 días, con la finalidad de obtener información complementaria acerca de la depuración de los contaminantes seleccionados en la muestra.

## **5.2 Conclusiones primera etapa experimental**

La caracterización fisicoquímica de la muestra indica que los niveles de contaminantes presentes en el agua de refinería estudiada son congruentes con el proceso del cual se originan, con altas probabilidades de ser tratados por procesos biológicos de acuerdo a la relación  $DBO_5/DQO$  medida.

De acuerdo a la caracterización microbiológica de la muestra, el agua residual de refinería contiene bacterias de tipo coliformes que indican una mezcla de residuales provenientes tanto del proceso de refinación como de las actividades humanas dentro de ésta industria. Además, la presencia de este tipo de microorganismos es indicio de que la muestra no contiene inhibidores del crecimiento.

El tiempo de residencia hidráulica necesario para disminuir mínimo 70% el nivel de DQO en la muestra es de 22 días, llegando a un máximo de 80% de remoción que se mantiene hasta 30 días de tratamiento biológico en aireación constante.

---

## CAPÍTULO 6.

### SEGUNDA ETAPA EXPERIMENTAL

Sabiendo que el contenido de la muestra en estudio no inhibe el crecimiento biológico y es factible de ser tratada biológicamente, se procedió a montar el reactor aerobio de flujo cerrado bajo las mismas condiciones de aireación, temperatura, volumen de inóculo y muestra, durante el tiempo total establecido en la primer etapa experimental, para determinar la depuración de los contaminantes seleccionados obteniendo las muestras necesarias para su evaluación y aplicando las respectivas pruebas de toxicidad y biodegradabilidad a tiempo cero y posterior al tratamiento.

Asimismo, se aclimató y caracterizó microbiológicamente el inóculo a utilizar en el montaje del reactor, con la finalidad de llevar a cabo el procesamiento y análisis de resultados integral.

#### 6.1 Análisis y discusión de resultados

##### 6.1.1 Caracterización Microbiológica del Inóculo

*Determinación del número más probable (NMP)*

Tabla 1. Análisis microbiológico del contenido del reactor al tiempo cero.

Volumen de Muestra (mL)	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3
10.0	+	+	+
1.0	+	+	+
0.1	+	-	-
<b>NMP = 460</b> bacterias coliformes /100mL muestra en reactor			

*Microorganismos presentes en el inóculo*

Los principales microorganismos encontrados durante la observación microscópica a 10 y 40X del inóculo durante el tiempo de aclimatación, incluye a ciliados como Rotíferos, Aspidiscas y Vorticellas de diferentes especies.

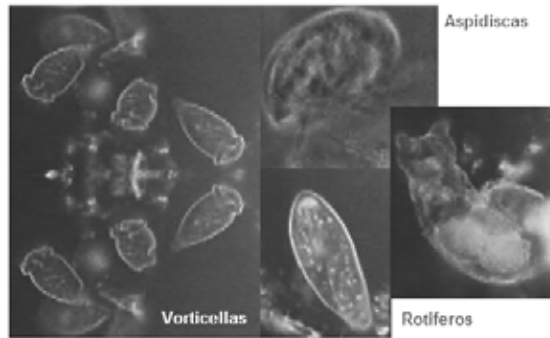


Figura 1. Microorganismos presentes en el inóculo utilizado.

### *Tinción Gram*

Los microorganismos observados después de realizar una tinción de Gram a la muestra de agua perfectamente homogenizada fueron los siguientes:

- Cocos Gram positivos con agrupación en cadenas largas
- Bacilos Gram positivos sin agrupación aparente
- Bacilos cortos Gram negativos sin agrupación aparente

La caracterización microbiológica del inóculo proporciona información complementaria que permite evaluar la viabilidad del consorcio de microorganismos utilizados durante las dos etapas experimentales.

Los protozoos detectados al microscopio coincidieron con aquellos reportados en la literatura como microbiota habitual de éste tipo de sistemas. Además, la diversidad y cantidad de bacterias encontradas en los lodos activados, predicen una actividad metabólica adecuada dentro del reactor.

### **6.1.2 Biodegradabilidad de la Muestra.**

Tabla 2. Biodegradabilidad de la muestra de agua sin tratamiento aerobio.

<b>TIEMPO (DÍAS)</b>	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>5</b>	<b>7</b>	<b>10</b>	<b>13</b>	<b>17</b>	<b>21</b>	<b>25</b>	<b>28</b>
<b>Remoción (%)</b>	<b>0</b>	<b>16.5</b>	<b>8.4</b>	<b>31.3</b>	<b>37.4</b>	<b>63.6</b>	<b>66.9</b>	<b>71.6</b>	<b>81.1</b>	<b>76.4</b>

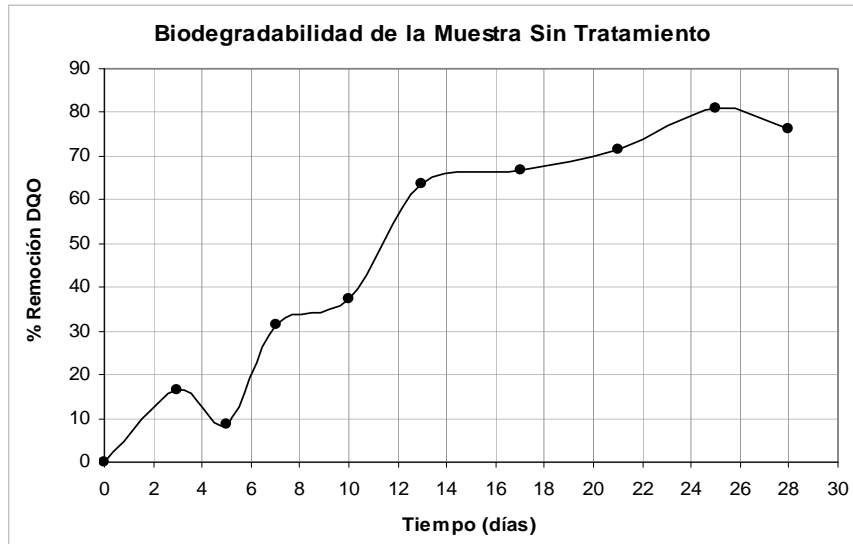


Figura 2. Gráfica de biodegradabilidad de la muestra de agua sin tratamiento aerobio.

## CONTROLES

Tabla 3. Remoción de DQO obtenida para los controles utilizados durante la prueba de biodegradabilidad aplicada a la muestra sin tratamiento aerobio.

	TIEMPO (DÍAS)	3	5	7	10	13	17	21	25	28
% Remoción	Procedimiento	26.1	35.2	30.3	56.5	63.7	75	73.4	79.5	<b>66.5</b>
	Esterilidad	3.8	1.8	0	5.6	0.3	3.7	0	0	<b>3.7</b>
	Adsorción	5.7	4.8	14.4	20.5	17.2	21.9	27.6	40	<b>31.7</b>
	Toxicidad	20.2	12.6	26.9	53.1	49.7	67.8	72.2	81.8	<b>75.3</b>

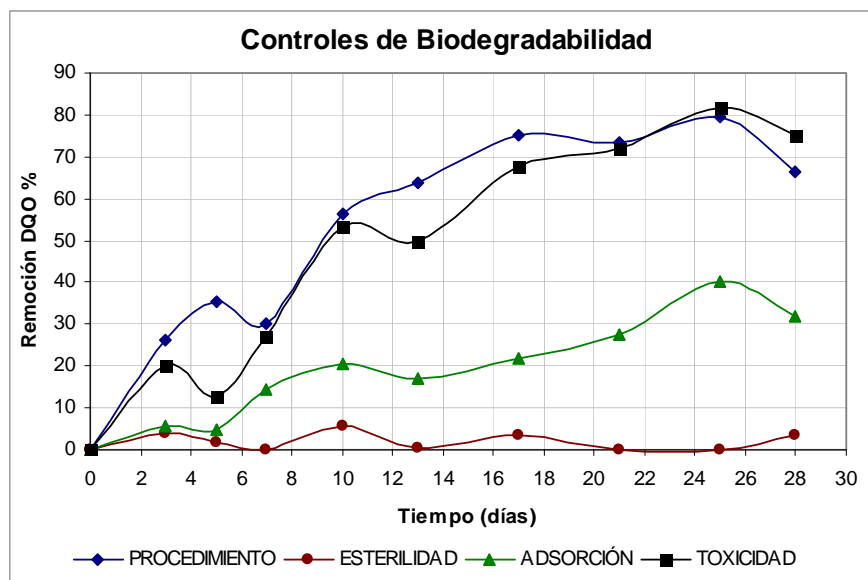


Figura 3. Gráfica de remoción de DQO obtenida para los controles utilizados durante la prueba de biodegradabilidad aplicada a la muestra sin tratamiento aerobio  
 A partir de los resultados obtenidos al aplicar la prueba de biodegradabilidad aerobia rápida a la muestra de agua residual de refinería, se determinó que es factible considerar dicha muestra como rápidamente biodegradable ya que se alcanza un 70% de remoción de DQO dentro del tiempo establecido para el estudio.

Tabla 4. Biodegradabilidad de la muestra de agua después del tratamiento aerobio.

<b>TIEMPO (DÍAS)</b>	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>5</b>	<b>7</b>	<b>10</b>	<b>13</b>	<b>17</b>	<b>21</b>	<b>25</b>	<b>28</b>
<b>Remoción (%)</b>	<b>0</b>	<b>14.8</b>	<b>16.3</b>	<b>38.0</b>	<b>31.6</b>	<b>64.1</b>	<b>55.2</b>	<b>62.7</b>	<b>77.6</b>	<b>70.2</b>

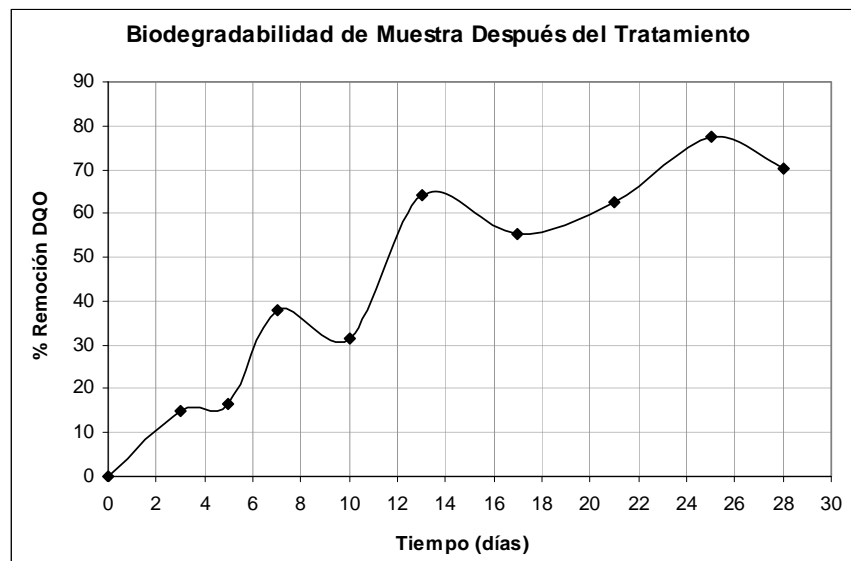


Figura 4. Gráfica de biodegradabilidad de la muestra después del tratamiento aerobio.

## CONTROLES

Tabla 5. Remoción de DQO obtenida para los controles utilizados durante la prueba de biodegradabilidad aplicada a la muestra después del tratamiento aerobio.

	<b>TIEMPO (DÍAS)</b>	<b>3</b>	<b>5</b>	<b>7</b>	<b>10</b>	<b>13</b>	<b>17</b>	<b>21</b>	<b>25</b>	<b>28</b>
<b>% Remoción</b>	<b>Procedimiento</b>	26.1	35.2	30.3	56.5	63.7	75	73.4	79.5	<b>66.5</b>
	<b>Esterilidad</b>	2.9	9.5	2.9	0	10.1	1.2	0	6.5	<b>1.2</b>
	<b>Adsorción</b>	0.9	3.7	14.6	24.2	14.6	24.5	19.6	25.5	<b>26.7</b>
	<b>Toxicidad</b>	28.7	21.1	35.3	53.9	57.19	68.4	65.9	75.3	<b>68.9</b>

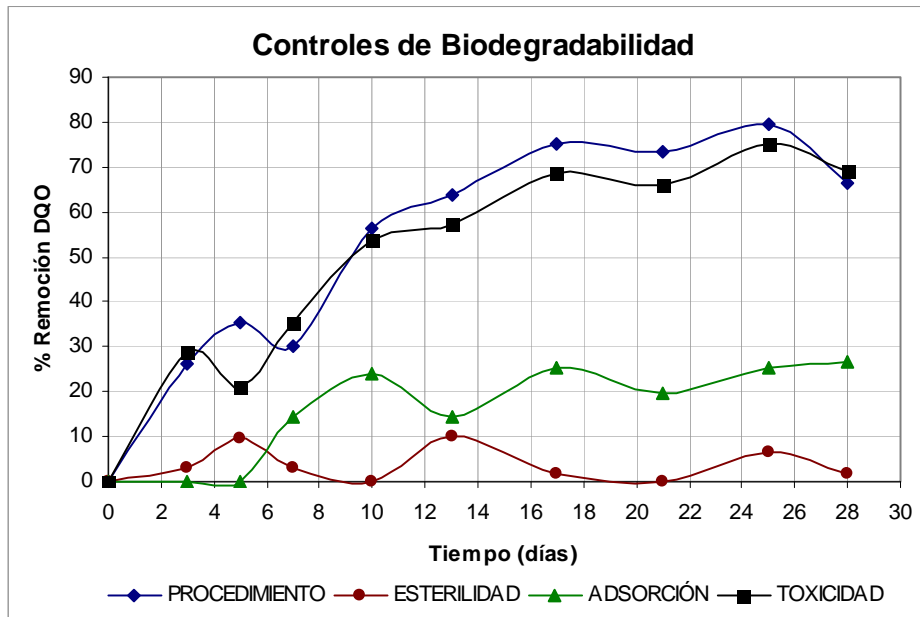


Figura 5. Gráfica de remoción de DQO obtenida para los controles utilizados durante la prueba de biodegradabilidad aplicada a la muestra después del tratamiento aerobio.

La segunda prueba de biodegradabilidad se aplicó a una muestra obtenida después de 30 días de tratamiento biológico en el reactor aerobio, obteniendo que el 70% de remoción mínimo se alcanza entre el día 22 y 23, lo que permite considerar que ésta muestra es rápidamente biodegradable sin sufrir modificaciones favorables o desfavorables en la velocidad de degradación por el previo proceso aerobio. Sin embargo, se esperaría una marcada disminución en su degradación por el bajo contenido de material biológicamente asimilable respecto al contenido en la muestra inicial, pero aún cuando dicho resultado no concuerda con lo esperado, es posible que la biodegradabilidad medida sea consecuencia de la actividad microbiana sobre el resto de los compuestos en el medio que en presencia de mayor cantidad de materia orgánica son factibles de utilizar como sustrato. Incluso, otra posibilidad a considerar es la utilización de los residuos biológicos del inóculo anterior como fuente de nutrientes para la nueva microbiota.

En ambos casos, antes y después del tratamiento, la validez de la prueba fue monitoreada por cinco controles que permiten eliminar errores por el comportamiento normal de la microbiota (control de inóculo); evaluar la degradación abiótica de la

---

sustancia (control de esterilidad) y la adsorción al material de vidrio utilizado, así como verificar la viabilidad del inóculo (procedimiento) y el posible efecto inhibitorio de la sustancia de prueba (toxicidad).

Como se puede observar en las gráficas y tablas correspondientes a los controles de ambas pruebas, los resultados obtenidos para el control de procedimiento indican que los lodos activados aclimatados se encontraban en condiciones adecuadas para ser utilizados como inóculo del procedimiento OECD. Además, los porcentajes de remoción medidos para los controles de adsorción y esterilidad indican que en ninguno de los casos, el material utilizado tiene propiedades adsorbentes sobre la muestra y que ésta no sufre procesos de degradación abióticos.

El respectivo control de toxicidad utilizado durante la realización de ambas pruebas indica que las muestras sometidas a estudio no contienen sustancias tóxicas o inhibitorias para la microbiota del inóculo utilizado. Sin embargo, se confirmó este dato mediante la aplicación de la prueba de toxicidad aguda con plantas terrestres OECD 208, utilizando semillas de lechuga.

### **6.1.3 Toxicidad aguda de la Muestra.**

*Prueba de toxicidad aguda por contacto empleando Colpoda cucullus.*

Tabla 6. Resultados obtenidos de la prueba de toxicidad aguda por contacto.

NÚMERO DE MICROORGANISMOS A PRUEBA = 10	TIEMPO (MINUTOS)				
	3	6	9	12	15
<b>Índice de mortalidad al contacto</b>	0%	0%	0%	0%	0%
<b>Disminución de movilidad</b>	No	No	No	No	No

La evaluación de toxicidad presuntiva se realizó con la finalidad de obtener una idea clara del rango de concentraciones útiles aplicables a la metodología OECD 208, de



manera rápida, económica y confiable. Aún cuando la muestra al 100% no mostró indicios de toxicidad en esta prueba, los datos se verificaron mediante el montaje de la prueba estándar OECD 208.

*Prueba de toxicidad aguda empleando Lactuca sativa L. (OECD 208 “Plantas Terrestres, prueba de crecimiento”).*

Tabla 7. Resultados del porcentaje de germinación obtenidos al aplicar la prueba de toxicidad aguda OECD 208, antes y después de airear por 30 días.

	MUESTRA		% GERMINACIÓN
		Control Positivo	
	Control Negativo		90
<b>Sin tratamiento aerobio</b>	100 %		90
	50%		81.7
	1%		88.3
<b>Después de airear 30 días</b>	100 %		93.3
	50%		81.7
	1%		91.7

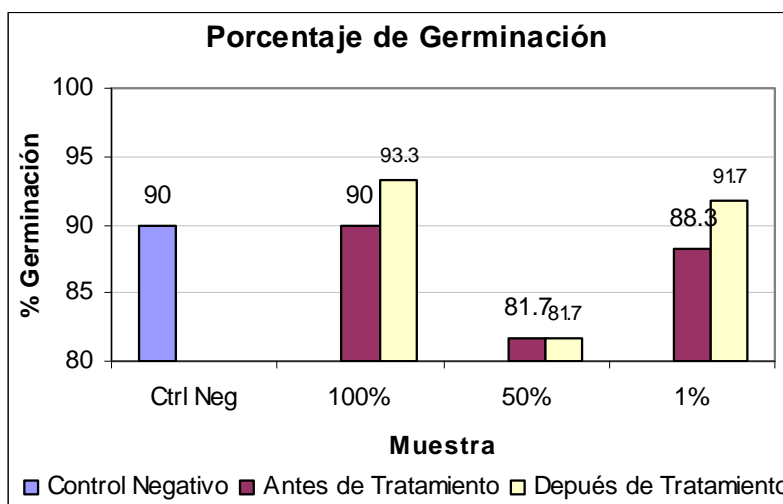


Figura 6. Gráfica comparativa del porcentaje de germinación obtenido al aplicar la prueba de toxicidad aguda OECD 208 antes y después del tratamiento aerobio.

El porcentaje de germinación medido no se vio afectado de manera drástica al utilizar la muestra original como sustancia de prueba, por lo que, aún cuando son notorias las variaciones respecto al control negativo, se puede considerar que las aguas residuales no inhiben el proceso de germinación en las semillas utilizadas.

Cuando se utilizó como sustancia de prueba las aguas residuales sometidas previamente al proceso aerobio, se observó que, pese a las variaciones observadas, dicha muestra no interfirió con el proceso de germinación. Por lo que es posible considerar que el tratamiento biológico utilizado no modifica la toxicidad inicial de la muestra utilizada.

Tabla 8. Resultados del porcentaje de crecimiento obtenidos al aplicar la prueba de toxicidad aguda OECD 208, antes y después de airear por 30 días.

	MUESTRA		% CRECIMIENTO
		<i>Control Positivo</i>	0
		<i>Control Negativo</i>	100
<b>Sin tratamiento aerobio</b>	100 %	97.2	
	50%	93.1	
	1%	98.6	
<b>Después de airear 30 días</b>	100 %	95.5	
	50%	73.8	
	1%	100	

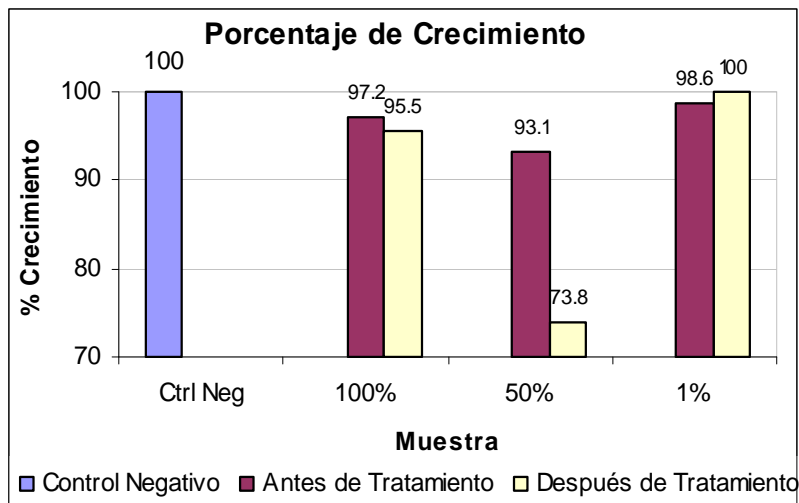


Figura 7. Gráfica comparativa del porcentaje de crecimiento obtenido al aplicar la prueba de toxicidad aguda OECD 208 antes y después del tratamiento aerobio.

Al evaluar el crecimiento de las semillas germinadas, se consideró el crecimiento promedio del control negativo como 100%. Observando que las semillas en contacto con la muestra al 100 y 1% de concentración, no presentan diferencias de crecimiento respecto al control. Sin embargo, los resultados obtenidos con la muestra al 50% antes y después del tratamiento aerobio muestran una menor elongación de radícula en ambos casos, con un mayor efecto de la muestra después del proceso biológico.

Pese a lo anterior y utilizando como referencia el control positivo, el porcentaje de crecimiento medido para las tres concentraciones utilizadas en ambas muestras, indican que las aguas residuales con y sin tratamiento no afectan de manera importante el crecimiento de las plántulas.

En los resultados esperados, el mayor efecto negativo sobre las semillas utilizadas sería con el 100% de muestra disminuyendo proporcionalmente con la concentración de ésta. Sin embargo, aún cuando a dilución de 50% ambos parámetros de toxicidad tienen valores inferiores respecto al control y las demás concentraciones, su efecto respecto al control positivo (0% germinación y elongación) es muy alto, por lo que tales resultados pueden ser causados por variaciones de experimentación y la muestra se debe considerar como no tóxica respecto al control positivo o tóxica de referencia.

### **3.1.4 Remoción de Contaminantes.**

Tabla 9. Resultados obtenidos para cada contaminante seleccionado a diferentes tiempos de tratamiento en el reactor aerobio.

<b>CONTAMINANTE</b>		<b>TIEMPO (días)</b>			
		<b>0</b>	<b>7</b>	<b>22</b>	<b>30</b>
<b>Fenoles</b>	mg/L	86.5	28.2	9.1	3.1
	<b>% Remoción</b>	<b>0</b>	<b>56.7</b>	<b>86.0</b>	<b>95.2</b>
<b>Nitrógeno Total</b>	mg/L	68.4	59.8	22.0	18.3
	<b>% Remoción</b>	<b>0</b>	<b>12.5</b>	<b>67.9</b>	<b>73.2</b>
<b>Sulfatos</b>	mg/L	123.8	113.1	49.5	48.5
	<b>% Remoción</b>	<b>0</b>	<b>8.6</b>	<b>60</b>	<b>60.8</b>
<b>Sulfuros</b>	mg/L	40.9	ND	36.2	33.1
	<b>% Remoción</b>	<b>0</b>	<b>ND</b>	<b>11.5</b>	<b>19.1</b>

ND: no determinado

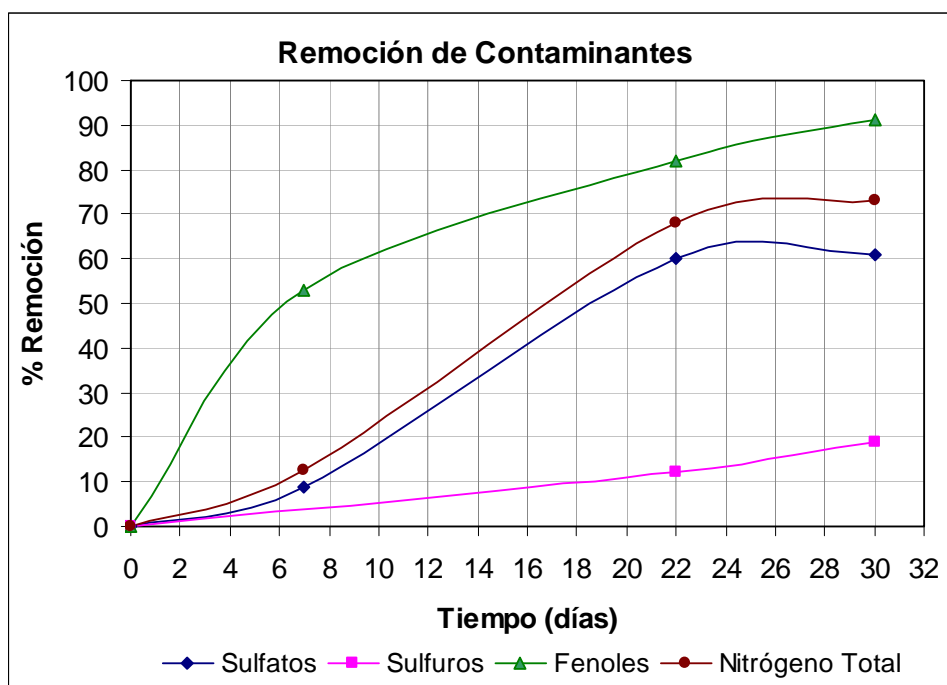


Figura 8. Gráfica comparativa de los porcentajes de remoción obtenidos para cada uno de los cuatro contaminantes durante el tratamiento biológico aerobio.

La evaluación de la muestra después del proceso aerobio, indica una remoción de contaminantes superior al 60% en el caso del ión sulfato, 19% para los sulfuros y arriba del 70% para los contaminantes nitrogenados y fenólicos. Éstos resultados son indicio de una asimilación de la mayor parte de las sustancias en la muestra original por los microorganismos del medio durante el proceso de aireación. El resto no degradado es posible que aún cuando no sean compuestos tóxicos, no presenten una alta biodisponibilidad para la microbiota utilizada como inóculo.

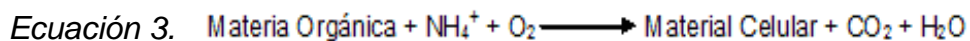
En el caso de los sulfuros medidos, se obtuvo el menor porcentaje de remoción respecto a los tres restantes, para lo cual, cabe recordar que en condiciones aerobias, los compuestos sulfatados son reducidos por diferentes microorganismos, mediante el proceso de reducción asimilatoria de sulfatos, a sulfuros, forma en la cual el azufre es integrado a proteínas. Por lo tanto, la baja depuración de éstos compuestos puede ser consecuencia de un metabolismo dirigido por altas concentraciones de compuestos sulfatados respecto a los sulfurados que las bacterias del medio asimilan con mayor

---

facilidad. Lo anterior, concuerda con el porcentaje de depuración obtenido para los derivados sulfatados después del proceso aerobio utilizado.

Respecto a los compuestos fenólicos, se sabe que dichos compuestos son tóxicos pero degradables hasta concentraciones de 500mg/L (Martínez, 2002), y de acuerdo a los resultados de toxicidad obtenidos, podemos afirmar que los niveles de formas fenólicas en la muestra son inferiores a los requeridos para inhibir el crecimiento de la microbiota presente en el reactor, por lo que su remoción pudo llevarse a cabo de manera satisfactoria sin interferir de manera importante con el crecimiento microbiano, pero sin factibilidad de considerar los niveles medidos como una depuración positiva a nivel ambiental de dichos compuestos.

El dato obtenido para compuestos nitrogenados puede ser probablemente el más controversial, ya que el valor de Nitrógeno en la muestra fue medido de manera total mediante la transformación de todas las formas de nitrógeno (nitritos y nitratos) a amoníaco (Nitrógeno Total Kjeldahl). Lo que evita conocer la contribución y depuración de cada tipo de compuesto nitrogenado dentro del reactor. Sin embargo, la información obtenida al evaluar éste parámetro es adecuada y suficiente para el estudio realizado, observando que la remoción de nitrógeno en la muestra alcanza porcentajes superiores al 70% y considerando dicho resultado como una depuración eficiente. Esta remoción es atribuida principalmente al proceso de oxidación biológica que sufre el amonio del medio para transformarlo a nitratos, compuestos que son integrados a proteínas vía su reducción biológica (Ecuación 3), por lo que el crecimiento microbiano implica asimilación de nitrógeno y en consecuencia disminución de dicho elemento en el medio.



El conjunto de resultados presentados permite predecir que la PTAR de una refinería petrolera podría reducir de manera importante los niveles de contaminantes sulfatados, fenólicos y nitrogenados de las aguas residuales que entran a lagunas de oxidación de dichas plantas, mediante un pre-tratamiento biológico de al menos 22

---

días de estas, pronosticando una calidad final del efluente adecuada y dentro de los niveles establecidos en la normatividad correspondiente. Sin embargo, para disminuir la cantidad de contaminantes sulfurados, es necesario buscar alternativas de tratamiento.

## **6.2 Conclusiones segunda etapa experimental**

Se determinó que los principales grupos de microorganismos presentes en el reactor aerobio de flujo cerrado son protozoarios de tipo Rotíferos, Aspidiscas y Vorticellas, además de bacterias como cocos y bacilos Gram positivo y bacilos cortos Gram negativo.

Se determinó, a partir de la aplicación del procedimiento OECD 301 A “Prueba de Biodegradabilidad Aerobia Rápida”, que una muestra de agua residual de una refinería de petróleo, antes y después de ser tratadas aerobiamente, puede considerarse como rápidamente biodegradable.

La determinación de la toxicidad aguda mediante la prueba de contacto con el ciliado *Colpoda cucullus*, permitió establecer que las concentraciones útiles para llevar a cabo la prueba de toxicidad aguda mediante el procedimiento OECD 208 son 100, 50 y 1% de muestra.

Se determinó, a partir de la aplicación del procedimiento OECD 208 “Plantas Terrestres, Prueba de Crecimiento” utilizando semillas de lechuga, que una muestra de aguas residuales de refinería, antes y después de ser tratadas aerobiamente, puede considerarse como no tóxica respecto a un tóxico de referencia.

A partir de la caracterización fisicoquímica de la muestra inicial, se evaluó la remoción de los contaminantes seleccionados en 60% para sulfatos; 19% para sulfuros; compuestos fenólicos 76% y 73% para los nitrogenados.

---

## CAPÍTULO 7.

### CONCLUSIONES GENERALES Y RECOMENDACIONES

#### 7.1 CONCLUSIONES GENERALES

- La determinación de la biodegradabilidad del agua residual proveniente de una refinería petrolera antes y después de someterla a un proceso biológico en aireación constante por 30 días, indica que tales muestras pueden considerarse como rápidamente biodegradables sin efectos aparentes sobre la velocidad de degradación por dicho tratamiento.
- Una muestra de agua residual proveniente de refinería, antes y después de ser tratadas biológicamente en un ambiente aerobio, pueden considerarse como no tóxicas respecto a una sustancia de referencia, sin efectos aparentes de dicho tratamiento sobre su toxicidad.
- De acuerdo a la caracterización fisicoquímica de las aguas residuales procedentes de una refinería de petróleo, es factible utilizar un tratamiento con microorganismos bajo condiciones aerobias permitiendo la remoción de contaminantes fenólicos, nitrogenados y sulfatados, siempre y cuando las condiciones de proceso no cambien.
- Los principales grupos de microorganismos que intervienen en el proceso de degradación son protozoos de tipo Aspidiscas, Rotíferos y Vorticellas, así como bacterias de tipo cocos y bacilos largos Gram positivos y bacilos cortos Gram negativos.

---

## 7.2 RECOMENDACIONES

- En definitiva, el tratamiento biológico aerobio es una de las opciones a considerar como punto crítico de optimización en un proceso de tratamiento de aguas residuales. Sin embargo, es necesario considerar los costos, la infraestructura y la factibilidad de utilizar dicho proceso como alternativa para mejorar la calidad del efluente final.
- Estudios acerca de la adaptabilidad del inóculo sobre la eficiencia de remoción, la determinación de los compuestos nitrogenados de manera individual así como el efecto de una aireación constante e intermitente, pueden proveer mayor información acerca de la depuración de los principales contaminantes encontrados en aguas residuales de refinerías.
- La continuidad de las pruebas de biodegradabilidad en un periodo mayor de tiempo aún cuando la muestra sea rápidamente biodegradable, puede proveer de información valiosa acerca del comportamiento de los microorganismos cuando los nutrientes se agotan totalmente.
- La evaluación de diversas concentraciones y tipo de inóculo sobre la degradación de una muestra específica puede permitir establecer la relación y posible efecto de estas variables sobre el sistema de estudio, derivando en otras opciones de optimización.



---

## BIBLIOGRAFÍA

1. Abner G. C. (2007). Determinación de la capacidad máxima de degradación de materia orgánica disuelta empleando reactores empacados experimentales. Tesis de Maestría en Ingeniería, México, UNAM.
2. Alva A. A., Kokossis A. C., Smith R. (2007). The design of water-using systems in petroleum refining using a water-pinch decomposition. *Chemical Engineering Journal*, 128, 33–46
3. Ambriz R. K. T. (1998) Estudio y aplicación de la prueba de biodegradabilidad aerobia rápida. Tesis de Licenciatura, México, UNAM.
4. American Public Health (APHA) (1998). Standard Methods for Examination of Water and Wastewater. Water Pollution Control Federation (WPCF), American Water Works Association (AWWA).
5. Belloc S. C. (2007). Tratamiento de aguas residuales provenientes del lavado de suelo contaminado con hidrocarburos del petróleo. Tesis de Licenciatura, México, UNAM.
6. Berthea L., Druilhea C., Massianib C., Tremiera A., Guardiaaa C. A. (2007). Coupling a respirometer and a pycnometer, to study the biodegradability of solid organic wastes during composting. *Structures and Environment*, 97, 75-88
7. Campins F. P., Meseguer L. S., Climent S. T., Molins L. C. (2008). A microscale Kjeldahl nitrogen determination for environmental waters. *Talanta*, 75, 1123-1126
8. Cassidy D.P., Beliab E. (2005). Nitrogen and phosphorus removal from an abattoir wastewater in a SBR with aerobic granular sludge. *Water Research*, 39, 4817–4823
9. Chapelle F. H. (1993). Ground-water microbiology and geochemistry. 1ª Edición. Editorial WILEY-LISS. USA.
10. Coelho A., Castro A. V., Dezotti M., Sant'Anna G. L. (2006). Treatment of petroleum refinery sourwater by advanced oxidation processes. *Journal of Hazardous Materials*, B137, 178–184
11. Comisión Nacional del Agua, CONAGUA (2007). Estadísticas del Agua. <http://www.conagua.gob.mx>
12. Cullimore R. D. (1993) Practical Manual of Groundwater microbiology. 1a Edición. Editorial Lewis Publishers. Michigan, USA.

- 
13. Eckenfelder W. W., Grau P. (1992). Water Quality Management Library Vol.1. Activated sludge process design and control theory and practice. Technomic. Pensilvania, E.E.U.A. pp 170-172.
  14. Eker S., Kargi F. (2007). Performance of a hybrid-loop bioreactor system in biological treatment of 2,4,6-tri-chlorophenol containing synthetic wastewater: Effects of hydraulic residence time. Journal of Hazardous Materials, 144, 86–92
  15. Grant W. D., Long P. E. (1989). Microbiología ambiental. 1ª Edición. Editorial ACRIBIA, S. A. Zaragoza, España.
  16. Gregor D., Milenko R. (2008). Aerobic and two-stage anaerobic–aerobic sludge digestion with pure oxygen and air aeration. National Institute of Chemistry. Ljubljana, Slovenia. Bioresource Technology 99, 100–109
  17. Hodgson, E. (2004). A text of modern toxicology. 3a Edición. Editorial John Wiley & sons, INC., New Jersey, USA.
  18. Kargi F., Kenya I. (2007). Para-chlorophenol containing synthetic wastewater treatment in an activated sludge unit: Effects of hydraulic residence time. Journal of Environmental Management, 84, 20–26
  19. Levent A., Hanife B. (2007). Sulfide removal in petroleum refinery wastewater by chemical precipitation. Journal of Hazardous Materials. 153, 462-469
  20. Lomelí R. M. G. (2008). Proyecto del CCH de la UNAM. En red: <http://www.sagan-gea.org>
  21. Luna Pabello V. M. (2006). Atlas de ciliados y otros microorganismos frecuentes en sistemas de tratamiento aerobio de aguas residuales. 1ª Edición. Departamento de biología, Facultad de Química, UNAM.
  22. Martínez G. A. (2002). Pretratamiento fenton para la remoción de fenoles y DQO de sosas gastadas de refinerías. Tesis de Maestría en Ingeniería. México, UNAM.
  23. Miranda S. B. J. (2007). Efecto de la variación de oxígeno disuelto en la velocidad específica de nitrificación de agua y agua residual enriquecida con amonio. Tesis de Licenciatura, México, UNAM.
  24. Mitchell R. (1993). Environmental microbiology. 2ª Edición. Editorial WILEY-LISS. New York, USA.
  25. Mohamed A. Z. (2006). Characterization and assessment of al ruwais refinery wastewater. Journal of Hazardous Materials. A136, 398-405

- 
26. Norma Oficial Mexicana NOM-001-SEMARNAT-1996. Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. Diario Oficial de la Federación, México D. F. México.
  27. Norma Oficial Mexicana NOM-052-SEMARNAT-2005. Que establece las características, el procedimiento de identificación, clasificación y los listados de los residuos peligrosos. Diario Oficial de la Federación, México D. F. México.
  28. Organization for Economic Cooperation and Development, OECD (1993). Guidelines for the testing of chemicals. Ready biodegradability 301A. "DOC Die-away-test". Paris, Francia.
  29. Organization for Economic Cooperation and Development, OECD (1993). Guidelines for the testing of chemicals. 208 "Terrestrial Plants, Grow Test". Paris, Francia.
  30. Petróleos Mexicanos, PEMEX (2007). Informe 2007 de desarrollo sustentable. En red:  
[http://desarrollosustentable.pemex.com/files/content/informes\\_docs/informe07/ids07\\_espanol.pdf](http://desarrollosustentable.pemex.com/files/content/informes_docs/informe07/ids07_espanol.pdf) (julio, 2008)
  31. Petróleos Mexicanos, PEMEX (1998). PEMEX-Refinería. La refinería de Salamanca. Octanaje, Vol. 20.  
<http://www.ref.pemex.com/octanaje/20sala.htm> (julio, 2008)
  32. Rheinheimer G. (1994). Microbiología de las aguas. 4ª Edición. Editorial ACRIBIA, S.A., Zaragoza, España.
  33. Rulbacaba A., Suárez O. M. E., Carrera J., Front J., Stüber F., Bengoa C., Fortuna A., Fabregat A. (2007). Biodegradability enhancement of phenolic compounds by hydrogen peroxide promoted catalytic wet air oxidation. *Catalysis Today*, 124, 191-197
  34. Vargas C. M. (2007). Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, SEMARNAT. Gestión Ambiental. Conceptos de Toxicología. En red:  
<http://www.semarnat.gob.mx/gestionambiental/Materiales%20y%20Actividades%20Riesgosas/plafest/conceptos.pdf> (junio, 2008)
  35. Stasinakis A. S., Petalas A. V., Mamais D., Thomaidis N. S. (2008). Application of the OECD 301F respirometric test for the biodegradability assessment of various potential endocrine disrupting chemicals. *Bioresource Technology*, 99, 3458-3467.
  36. Tyagi R. D. (1992). Performance of RBC coupled to a polyurethane foam to biodegrade petroleum refinery wastewater. *Environmental Pollution*, 76, 61-70

- 
37. Vaiopoulou E., Melidis A. P., Aivasidis. (2007). An activated sludge treatment plant for integrated removal of carbon, nitrogen and phosphorus. *Desalination*, 211, 192–199
  38. Vázquez-Rodríguez G. A., Garabétian F., Rols J. L. (2007). Inocula from activated sludge for ready biodegradability testing: Homogenization by preconditioning. *Chemosphere*. 68, 1447-1454

---

## ANEXOS

### ANEXO A.

#### **OECD 301 A. “PRUEBA DE BIODEGRADABILIDAD AEROBIA RÁPIDA”** (OECD, Ready Biodegradability 301 A DOC Die-away-test, 1993)

##### Introducción

Una solución o suspensión de la sustancia de prueba, en un medio mineral, es inoculada e incubada bajo condiciones aerobias en la oscuridad o luz difusa. La cantidad de carbono orgánico disuelto (COD) medido como demanda química de oxígeno (DQO) en la solución de prueba, aportada por el inóculo debe mantenerse lo mas baja posible, en comparación con la cantidad de materia orgánica aportada por la sustancia de prueba. Para considerar la actividad endógena del inóculo se corre un blanco en paralelo con inóculo, pero sin sustancia de prueba. Aunque la actividad endógena de las células en la presencia de un compuesto químico no corresponde exactamente a la del control endógeno. Un compuesto de referencia se corre en paralelo para evaluar la operación del procedimiento. La prueba es continua por un periodo de 28 días. Sin embargo, pueden ser terminadas después de éste tiempo para obtener un valor constante en la curva de biodegradación por lo menos en tres determinaciones, pero en tales casos, el compuesto químico no puede ser clasificado como rápidamente biodegradable.

##### Principio

Un volumen conocido del medio mineral inoculado, conteniendo una concentración conocida de la sustancia de prueba (10-40 mg de DQO/L) como única fuente de carbono orgánico, se airea constantemente en condiciones de luz difusa y oscuridad a  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ . El proceso de biodegradación es seguido por el análisis de DQO con una frecuencia de intervalos suficiente durante un periodo de 28 días. El grado de biodegradación es calculado de acuerdo a la concentración de DQO removida (corregida de acuerdo a los datos del blanco control del inóculo) como porcentaje de la concentración inicialmente presente. También la biodegradación puede ser calculada a partir del análisis del DQO al inicio y al final de un ensayo con las mismas características. Los niveles de aceptación de biodegradabilidad aerobia rápida son 70% de remoción de DQO dentro de los 28 días de la prueba.

---

Para evaluar el procedimiento, se utiliza acetato de sodio como compuesto de referencia, conocido como rápidamente biodegradable, y es evaluado preparando los matraces adecuados en paralelo como parte de la prueba normal.

Debido a la naturaleza de la mezcla de la población bacteriana en el inóculo usado, la determinación debe ser realizada por lo menos en duplicado. Como inóculo se utilizan lodos activados provenientes del tanque de aireación de una planta de tratamiento que trate, preferentemente, aguas residuales domésticas. Puede ser preacondicionado a las condiciones experimentales, pero no se preadaptado a la sustancia de prueba, mediante la aireación del lodo activado por un periodo de 5 a 7 días a las condiciones de prueba.

Los matraces se preparan colocando 800mL de medio mineral en matraces de 2 litros y agregando el volumen suficiente de las soluciones stock, sustancias de prueba de prueba y referencia por separado, para obtener una concentración entre 10 y 40 mg COD/L del sustrato. Verificar los valores de pH y ajustar, de ser necesario, a 7.4. Inocular los matraces con el lodo activado para obtener una concentración final de SST no mayor a 30mg/L. Preparar también los controles del inóculo, degradación abiótica, adsorción y toxicidad en el medio mineral. La sustancia tóxica adecuada para el control de toxicidad es HgCl<sub>2</sub> a la concentración correcta.

Aforar todos los volúmenes a 1L con medio mineral y, después de mezclar, tomar una muestra de cada matraz para determinar la concentración inicial de COD por duplicado. Cubrir la abertura de los matraces con algodón, para permitir el libre intercambio de aire entre y cubrir el cuerpo de los mismos con aluminio para mantenerlos en oscuridad.

Distribución de los matraces:

<b>Matraz</b>	<b>Etiqueta</b>	<b>Contenido</b>
1 y 2	Solución de prueba	Sustancia de prueba e inóculo
3 y 4	Blanco de inóculo	Inóculo
5	Control de procedimiento	Compuesto de referencia e inóculo
6	Control de esterilidad	Sustancia de prueba y agente esterilizante
7	Control de adsorción	Sustancia de prueba, inóculo y agente esterilizante
8	Control de toxicidad	Sustancia de prueba, compuesto de referencia e inóculo

---

## Reactivos

- *Solución stock para medio mineral:*

(a) Disolver 8.5g de fosfato monobásico de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), 21.75g fosfato dibásico de potasio ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), 33.40g de fosfato dibásico de sodio heptahidratado ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), 0.5g de cloruro de amonio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) y aforar a 1L. El pH de ésta solución debe ser de 7.4.

(b) Disolver 27.5g de cloruro de calcio  $\text{CaCl}_2$  y aforar a 1L con agua destilada.

(c) Disolver 22.5g de sulfato de magnesio heptahidratado ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) y aforar a 1L con agua destilada.

(d) Disolver 0.25g de cloruro férrico hexahidratado ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) y aforar a 1L con agua destilada.

- *Medio mineral:*

Mezcle 10mL de la solución (a) con 800mL de agua, enseguida agregue 1mL de las soluciones (b), (c) y (d) y afore a 1L con agua destilada.

## Materiales

- Matraces Erlenmeyer de 2L, para obtener un volumen necesario para las determinaciones de DQO. Los matraces deben ser cuidadosamente limpiados con agua y jabón, enjuagados con ácido sulfúrico al 20%, y posteriormente con agua destilada y secados para cada prueba que se realice.
- Un cuarto de incubación con un control automático de temperatura.
- Bombas de aireación con suficiente poder para mantener condiciones aerobias en los matraces, la aireación proporciona también agitación de la muestra.
- Centrifuga, con los tubos correctos para tal efecto.
- Equipo para la determinación de DQO.

## Procedimiento

1. Mezclar el contenido de cada matraz.
2. Tomar el volumen mínimo necesario de la suspensión.
3. Centrifugar la muestra inmediatamente.
4. Filtrar el sobrenadante utilizando papel Whatman No. 1 o equivalente
5. Determinar la concentración de COD por duplicado.

---

## Expresión de Resultados

Porcentaje de degradación: 
$$D_t = \left[ 1 - \frac{C_t - C_{bl(t)}}{C_o - C_{bl(o)}} \right] \times 100$$

Donde:

Dt = % de degradación al tiempo t;

Co = concentración inicial de DQO en el medio inoculado con la sustancia de prueba;

Ct = concentración de DQO en el medio inoculado con la sustancia de prueba al tiempo t;

Cbl(o) = concentración inicial de DQO en el blanco del medio mineral inoculado;

Cb(t) = concentración en el blanco del medio mineral inoculado al tiempo t .

Todos los datos son los promedios de las concentraciones expresados en mg DQO/L.

Porcentaje de degradación abiótica: 
$$\% \text{ Degradación abiótica} = \frac{C_{\text{S}(o)} - C_{\text{S}(t)}}{C_{\text{S}(o)}} \times 100$$

Donde:

CS(o) = concentración de DQO en el control estéril al día cero;

CS (t) = concentración de DQO en el control estéril al día t.

## Observaciones

En caso de que el análisis de las muestras no sea realizado el mismo día, almacene las muestras entre 2 y 4°C por un periodo máximo de 48 horas o a menos de -18°C por un periodo más prolongado.



---

## **ANEXO B.**

### **i) ENSAYO DE TOXICIDAD AGUDA POR CONTACTO**

#### ***Utilizando al Ciliado Colpoda cucullus.***

##### Procedimiento:

- Tomar una muestra del cultivo y verificar al microscopio la viabilidad de los ciliados.
- Utilizando una pipeta Pasteur, extraer 10 microorganismos del cultivo y colocar en un portaobjetos adicionando una o dos gotas de agua destilada para evitar deshidratación.
- Adicionar de una a dos gotas de la solución en estudio a una concentración definida.
- Observar a intervalos de 3 minutos durante 15 minutos para detectar disminución de movilidad y/o muerte, registrando todos los resultados obtenidos.
- Repetir el procedimiento tantas veces sea necesario para conocer la CL<sub>50</sub>.

### **ii) OECD 208. “PLANTAS TERRESTRES, PRUEBA DE CRECIMIENTO”**

#### ***Utilizando semillas de lechuga.***

(OECD 208 Terrestrial Plants, Grow Test, 1993)

##### Introducción

La prueba de toxicidad aguda con semillas de lechuga (*Lactuca sativa L.*) es una prueba estática en la que se pueden evaluar los efectos fitotóxicos de compuestos puros o mezclas complejas en el proceso de germinación de las semillas y en el desarrollo de las plántulas durante los primeros días de crecimiento. Como puntos para la evaluación de los efectos fitotóxicos, se determina la inhibición en la germinación y la inhibición en la elongación de la radícula y el hipocotilo. La medida de elongación del hipocotilo se considera desde el nudo hasta el sitio de intersección de los dos cotiledones.

Es importante destacar que durante el periodo de germinación y los primeros días de desarrollo de la plántula ocurren numerosos procesos fisiológicos en los que la presencia de una sustancia tóxica puede interferir alterando la supervivencia y el desarrollo normal de la planta, siendo por lo tanto una etapa de gran sensibilidad frente a factores externos adversos.

---

Por otra parte, muchas de las reacciones y procesos involucrados son generales para la gran mayoría de las semillas, por lo que la respuesta de esta especie y los datos obtenidos a partir de la aplicación de esta prueba son en gran medida representativos de los efectos en semillas o plántulas en general. El éxito o aptitud de una plántula para establecerse en un ambiente determinado es relevante para garantizar la supervivencia de la especie.

La evaluación del desarrollo de la radícula y del hipocotilo constituyen indicadores representativos para determinar la capacidad de establecimiento y desarrollo de la planta.

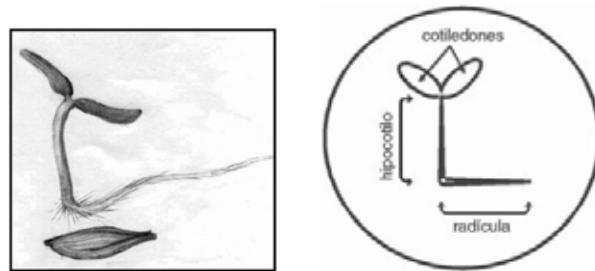


Figura 1. Esquemas de plántula de *Lactuca sativa* L.

A diferencia de la prueba tradicional de germinación de semillas, la evaluación del efecto en la elongación de la radícula y del hipocotilo de las plántulas permite ponderar el efecto tóxico de compuestos solubles presentes en niveles de concentración tan bajos que no son suficientes para inhibir la germinación, pero que sin embargo pueden retardar o inhibir completamente los procesos de elongación de la radícula o del hipocotilo, dependiendo ello del modo y sitio de acción del compuesto. De esta manera, la inhibición en la elongación de la radícula e hipocotilo constituyen indicadores subletales muy sensibles para la evaluación de efectos biológicos en vegetales, aportando información complementaria a la proporcionada al estudiar el efecto en la germinación.

Este ensayo puede ser aplicado para la evaluación de la toxicidad de compuestos puros solubles, de aguas superficiales, aguas subterráneas, aguas para consumo humano, aguas residuales domésticas e industriales, además de lixiviados de suelos, sedimentos, lodos u otras matrices sólidas.

Permite evaluar la fitotoxicidad de muestras coloreadas o con elevada turbiedad de manera directa y sin necesidad de filtración previa, reduciéndose así las interferencias debidas al pretratamiento, además de simplificar el procedimiento de prueba. Si bien *L. sativa* no es una especie representativa de ecosistemas acuáticos, la información generada a partir de esta prueba de toxicidad proporciona datos acerca del posible efecto de los contaminantes en las

---

comunidades vegetales cercanas a las márgenes de cuerpos de agua contaminados, siendo también una especie interesante de considerar por su importancia desde el punto de vista hortícola. Por otra parte, es de fácil y rápida germinación, por lo que es posible desarrollar la prueba en pocos días.

### Materiales

- Semillas de lechuga (*Lactuca sativa L var. mantecosa*), certificadas, sin fungicidas o plaguicidas, con buen poder germinativo y baja variabilidad en la elongación de la radícula e hipocotilo. Almacenadas a 4°C y en ambiente seco.
- Cajas Petra 100mm de diámetro.
- Papel filtro Whatman número 3 (o equivalente), 90mm de diámetro.
- Matraces aforados de 50mL
- Pipetas volumétricas de 1, 2, 5 y 10 mL.
- Regla u otro elemento de medición.
- Bolsas plásticas.
- Cámara oscura termostatzada ( $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ).

Agua dura reconstituida para dilución (APHA, 1998).

### Preparación de diluciones.

Para realizar una curva dosis-respuesta se recomienda preparar diluciones de la muestra o compuesto a estudiar, de manera que se obtengan valores de toxicidad intermedios entre el 100 y 0%. Para la preparación de cada dilución se utiliza agua dura reconstituida, realizando el control negativo con el agua de dilución empleada.

Con el fin de controlar la sensibilidad de las semillas, simultáneamente a la evaluación de la toxicidad de una muestra debe realizarse un control positivo, utilizando, por ejemplo, una sal de Zn(II) como tóxico de referencia. La concentración de prueba de este control es la correspondiente a la  $CI_{50}$  para el lote de semillas en uso.

### Protocolo de realización.

- Colocar en una caja Petri un disco de papel filtro.
- Marcar correctamente cada caja con la dilución correspondiente, así como la fecha y hora de inicio y término del bioensayo.

- Saturar el papel de filtro con 4 o 5 mL de la dilución evitando que se formen bolsas de aire.
- Con la ayuda de una pinza, colocar cuidadosamente veinte semillas, dejando espacio suficiente entre ellas para permitir la elongación de las raíces.
- Tapar las cápsulas y colocarlas en bolsas plásticas para evitar la pérdida de humedad. Dado que algunas variedades de semillas de lechuga requieren oscuridad para que se produzca la germinación, las cajas de Petri deben mantenerse en oscuridad durante el periodo de incubación, que será de 120 h a una temperatura de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ . Realizar repeticiones para cada dilución ensayada.
- Terminado el periodo de exposición, se procede a cuantificar el efecto en la germinación y elongación de la radícula y del hipocotilo.

Tabla 1. Condiciones de la prueba de toxicidad aguda.

Tipo de ensayo	Estático
Temperatura	$22 \pm 2^\circ\text{C}$
Calidad de luz	Oscuridad
Volumen de solución de prueba	4 mL
Agua de dilución	Agua dura reconstituida
Número de semillas por réplica	Veinte
Número de réplicas	Tres
Duración de la prueba	120h
Efecto medido	Inhibición en elongación de la radícula e hipocotilo. Inhibición en la germinación.
Resultado final	$CE_{50}$ , $CI_{50}$ ó % inhibición.
Aceptabilidad de los resultados	Germinación > 90% Control positivo y negativo de acuerdo con los valores: admitidos en las cartas control
Control positivo	Cualquier sal de Zn (II)

#### Medida de los puntos finales de evaluación de la fototoxicidad.

Cada punto final se evalúa comparando el efecto generado en los organismos expuestos a la muestra con respecto a la respuesta en los organismos del control negativo

#### Efecto en la germinación.

---

Registrar el número de semillas que germinaron normalmente, considerando como criterio de germinación la aparición visible de la radícula

#### Efecto en la elongación de la radícula e hipocotilo

Utilizando una regla o papel milimetrado, medir cuidadosamente la longitud de la radícula y del hipocotilo de cada una de las plántulas correspondientes a cada concentración de tóxico o dilución de muestra y a los controles.

Antes de retirar las plántulas de las cápsulas de Petri para evaluar el efecto en los puntos finales anteriormente mencionados, es importante realizar una observación detallada del estado general de las mismas y del crecimiento de la radícula sobre el papel de filtro. Informar cualquier indicador de fitotoxicidad o de crecimiento anormal en las plántulas tratadas y en los controles (ápices radiculares con necrosis, pelos absorbentes poco desarrollados, radículas con crecimiento ensortijado, necrosis en los cotiledones, etcétera). La necrosis (presencia de tejido muerto) se evidencia como manchas localizadas de coloración parda, blanca o marrón. Al evaluar el efecto en la germinación, consignar además aquellas semillas con germinación anormal (emergencia de cotiledones o cotiledones e hipocotilo solamente, pero sin emergencia de la radícula) o con desarrollo de hongos.

#### Control de calidad

El ensayo deberá repetirse en caso de que los controles negativos presenten porcentajes de germinación inferiores al 90% y una alta variabilidad en la elongación de la radícula ( $CV \geq 3$ ) o si el control positivo presenta una variación de la sensibilidad de las semillas fuera de lo permitido por las cartas control.

#### Interferencias

- Toxicidad del papel filtro empleado
- Suciedad o contaminación de las cajas Petri
- Exceso o déficit de agua o de muestra utilizada para empapar el papel
- Temperatura inadecuada durante el proceso de incubación

#### Interpretación de los resultados

---

Los efectos cuantificados sobre la elongación de la radícula o del hipocotilo son efectos subletales. La inhibición en la germinación podría considerarse como un efecto letal, siempre y cuando podamos corroborar que finalizada la exposición a una muestra las semillas no germinaron por muerte del embrión, y que no existe simplemente un retraso en el proceso de germinación, manteniéndose la viabilidad de la semilla. La inhibición en la germinación registrada al finalizar la prueba, se considera fitotoxicidad, aunque el efecto en la germinación sea reversible.

Otro aspecto a considerar es el mayor desarrollo en la elongación de la radícula o el hipocotilo en algunas muestras con respecto al control. La exaltación en un punto final no debe ser interpretada como un efecto favorable o estimulante. Si bien es posible que muchos compuestos como iones de Cu o Zn) a bajas concentraciones produzcan exaltación por ser micronutrientes vegetales, esta respuesta debe ser evaluada de manera conjunta con los efectos registrados en otras pruebas.

---

## **ANEXO C.**

### **DETERMINACIÓN DE DQO. MÉTODO DE REFLUJO CERRADO**

(OECD, Ready Biodegradability 301 A DOC Die-away-test, 1993. Modificado a micrométodo para ser aplicado a escala laboratorio)

#### Introducción

La demanda química de oxígeno (DQO) es ampliamente utilizada como una forma de medir la carga contaminante de desechos domésticos e industriales. El análisis de la DQO se basa en el hecho de que todos los compuestos orgánicos, con algunas excepciones pueden ser oxidados por la acción de un oxidante fuerte bajo condiciones ácidas a dióxido de carbono y agua, sin considerar la biodisponibilidad de las sustancias. Una de sus ventajas es la rapidez con que se obtiene la información (3h), sin embargo, no evalúa si la materia orgánica es biodisponible.

#### Principio

La muestra es digerida con dicromato de potasio en un medio fuertemente ácido, en presencia de un catalizador a alta temperatura. Después de la digestión, el dicromato remanente es titulado con sulfato ferroso amoniacal. De esta forma se puede conocer la cantidad de dicromato de potasio consumido y por lo tanto la cantidad de materia orgánica oxidada en términos de equivalentes de oxígeno.

Interferencias: Ciertos iones inorgánicos como los cloruros, se oxidan bajo las condiciones de oxidación de la DQO, incrementando el resultado del análisis. Esta interferencia se puede eliminar con la adición de sulfato de plata al ácido sulfúrico (ver preparación de reactivos).

La ventaja de este método, es su economía en el empleo de reactivos, pero si la muestra contiene sólidos, debe homogenizarse para obtener resultados reproducibles.

#### Reactivos

- Reactivo de  $H_2SO_4/AgSO_4$ : 0.12g de  $AgSO_4$  en 1L de  $H_2SO_4$  concentrado. Permitir su disolución de 1 a 2 días a temperatura ambiente.
- Solución estándar de dicromato de potasio ( $K_2Cr_2O_7$ ) 0.25 N: 12.25g de  $K_2Cr_2O_7$ , previamente secado a  $103^\circ C$  por 2 horas, en 1L de agua destilada.
- Solución indicadora de ferroína: 1.485g de 1,10 fenantrolina monohidratada y 695mg de  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  en 100 mL de agua destilada.

- 
- Solución de sulfato ferroso amoniacal (FAS): 39.2 g de  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  en 600mL de agua destilada, agregar cuidadosamente 20mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado. Enfriar y aforar a 1L con agua destilada. Esta solución tiene una concentración aproximada de 0.1N, su concentración exacta se conoce cuando se titula el Branco frío, el cual se corre junto con las muestras.

Material:

- Tubos de borosilicato 16 x 150mm con tapa de rosca recubierta de teflón
- Equipo de filtración milipore
- Filtros Whatman GF/A de 5cm de diámetro
- Estufa a 150°C
- Pipetas volumétricas
- Matraces Erlenmeyer de 50mL
- Gradillas
- Matraz Kitasato
- Guantes de Asbesto

Recolección, preparación y almacenamiento de muestras

1. La muestra se debe analizar inmediatamente después de su toma, en caso contrario debe conservarse en refrigeración a 4° C, además de la adición de ácido sulfúrico hasta  $\text{pH} < 2$ .
2. El tiempo máximo de almacenamiento previo al análisis es de 28 días.

Procedimiento:

Como medida de precaución se recomienda utilizar guantes y lentes de protección cuando se adicionen los reactivos que contienen  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .

1. Lavar previamente los tubos y tapones a utilizar con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 20% para evitar contaminación de las muestras. Para análisis subsecuentes lavar los tubos con agua de la llave y posteriormente con agua destilada, secar perfectamente antes de adicionar los reactivos.
2. En un tubo de 16 x 150mm, colocar 5 mL de muestra o su dilución (previamente filtrada si es necesario), adicionar 3 mL de solución de dicromato y con la punta de una espátula una pequeñísima porción de sulfato mercurico (catalizador).



---

En los blanco, se adiciona agua destilada en lugar de la muestra. Si se desconoce totalmente la DQO de la muestra se prueban diferentes diluciones de 1:100 y 5:100, la dilución más recomendable será aquella que no cambie la coloración del dicromato.

3. Adicionar cuidadosamente 7mL del reactivo de ácido sulfúrico, permitiendo que resbale por las paredes internas del tubo. Si es necesario, colocar un baño de agua fría para disipar el calor de la reacción.
4. Cerrar herméticamente los tubos, invertir cada tubo varias veces para mezclar completamente y verificar que no hay fuga. En caso de presentarse fuga, preparar otro tubo con la muestra correspondiente.
5. Colocar los tubos en la estufa precalentada a  $150^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , para permitir la digestión durante 2 horas.
6. Preparar tubos adicionales que servirán como blanco frío para conocer la concentración exacta de la solución FAS. Este tubo se prepara simultáneamente a las muestras, pero se mantiene bien tapado a temperatura ambiente.
7. Dejar enfriar los tubos a temperatura ambiente, retirar las tapas y verter su contenido en matraces.
8. Enjuagar el tubo de muestra con un volumen pequeño de agua destilada y adicionar el matraz.
9. Agregar dos gotas del indicador de ferroína y titular con la solución FAS agitando constantemente, hasta el vire del indicador de azul verdoso a café rojizo.

#### Expresión de Resultados:

Para conocer el valor de DQO total y soluble de una muestra, siga el siguiente ejemplo de cálculo.

FAS (mL) gastados en la titulación:

Blanco caliente (BC) = 3mL      Blanco frío (BF) = 3mL      FAS de la muestra = 2.3mL

Volumen de la muestra = 5mL

#### **1. Normalidad de solución FAS**

$N_{\text{FAS}} = (\text{mL solución } \text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7) (N \text{ } \text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7) / \text{mL FAS}_{\text{BF}}$

*Sustituyendo:*

$N_{\text{FAS}} = 3 \text{ mL } (0.25 \text{ N}) / 3 \text{ mL} = 0.25 \text{ N}$

---

## 2. DQO expresada en mg O<sub>2</sub>/L

$$\text{DQO} = [ (\text{mL FAS}_{\text{BC}} - \text{mL FAS}_{\text{Muestra}}) (N_{\text{FAS}}) (8) (1000) / \text{mL muestra} ] \times \text{dilución}$$

*Sustituyendo:*

$$\text{DQO} = [ (3 \text{ mL} - 2.3 \text{ mL}) (0.1\text{N}) (8) (1000) / 5 \text{ mL} ] \times 10 = 4320 \text{ mg O}_2/\text{L}$$

Donde: mL FAS<sub>BC</sub> = volumen de la solución FAS empleado para titular el blanco caliente

mL FAS<sub>Muestra</sub> = volumen de la solución FAS empleado para titular la muestra

N<sub>FAS</sub> = normalidad de la solución FAS obtenida al titular el blanco frío

8 = equivalencias de oxígeno

1000 = factor de conversión de mL a litros

### Observaciones

- Homogenizar la muestra antes de tomar cada alícuota
- Procurar que al adicionar el ácido sulfúrico, la pérdida de material volátil sea mínima, esto se logra agregando muy despacio dicho reactivo.
- Si al agregar la muestra, el dicromato toma un color verde, descartar este tubo y disminuir el tamaño de la muestra diluyéndola.
- El punto de equivalencia en la titulación será el primer vire de azul verdoso a café rojizo, aún cuando el primer color vuelva a aparecer.

### Limitaciones e Interferencias

Los compuestos alifáticos volátiles de cadena abierta no se oxidan.

El método no oxida uniformemente todos los materiales orgánicos. Algunos compuestos son muy resistentes a la oxidación, mientras que otros tales como los carbohidratos son fácilmente oxidables.

### Manejo de residuos

Los residuos generados de éste método son enviados en envases de vidrio bien tapados al departamento correspondiente de la Facultad de Química, UNAM, para su posterior tratamiento.

---

## **ANEXO D.**

### **DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES**

(Modificación al Método volumétrico establecido en la NMX-AA-050-2001 para ser aplicado a escala laboratorio)

#### Introducción

Los fenoles, definidos como hidroxiderivados del benceno y sus núcleos condensados, pueden estar presentes en las aguas residuales domésticas e industriales (desinfectantes, fungicidas, germicidas y conservadores), en las aguas naturales y en los suministros de agua potable. El fenol es conocido por el público como ácido carbólico. Ha sido muy usado como germicida.

El fenol se extrae del alquitrán de hulla y se produce sintéticamente en grandes cantidades. Existe como componente natural en los desechos industriales del gas de carbón, del carbón coque y de las industrias del petróleo, además de encontrarse en una gran variedad de desechos industriales de procesos que utilizan el fenol como materia prima.

Para prevenir problemas como daños hacia los ecosistemas y riesgos a la salud humana, es muy importante el conocer cuantitativamente la presencia de éstos.

#### Principio

Después de concentrar y extraer los compuestos fenólicos, se somete a una bromación para posteriormente, titular por retroceso la cantidad de éstos en la muestra.

#### Reactivos

- Solución de hidróxido de sodio 1N
- Solución de bromuro de potasio al 25% (25g de bromuro de potasio en 100mL de agua destilada)
- Solución de yoduro de potasio al 20% (20g de yoduro de potasio en 100mL de agua destilada)
- Soluciones de ácido clorhídrico 1N y al 0.5N
- Solución titulante de tiosulfato de sodio 1N
- Solución de bromato de potasio al 0.3% (0.3g de bromato de potasio en 100mL de agua destilada)
- Éter etílico 99.8%
- Agua destilada

---

## Materiales

- 2 Matraces Erlenmeyer de 250mL
- Matraz Erlenmeyer de 1L
- Embudo de separación
- Bureta de 100mL
- Parrilla de agitación
- Barra magnética
- Potenciómetro que mida el pH calibrado
- Varilla de vidrio para agitación
- 5 Vasos de precipitados de 250mL
- 1 Recipiente de vidrio grande donde quepa el matraz de 1 L, para baño María
- 2 Probetas de 50mL
- Balanza analítica
- Espátula

## Recolección, preparación y almacenamiento de muestras

1. Debe tomarse un mínimo de 2 L de muestra en un envase de vidrio o polietileno. Pueden utilizarse muestras compuestas o simples
2. Si las muestras no se analizan en un período de 4 h después de la toma, acidificar la muestra con 2 mL de ácido sulfúrico concentrado por L de muestra y 5 mL de la disolución de sulfato de cobre
3. Mantener en refrigeración a 4°C hasta su análisis
4. El tiempo máximo de almacenamiento previo al análisis es de 28 días.

## Procedimiento

1. Se procede a una extracción líquido-líquido en un embudo de separación, introducir el volumen de 50 mL de muestra final y tratar 2 veces con 10 mL de éter.
2. Colocar la fase orgánica en un vaso de precipitado para utilizarlo posteriormente, la fase acuosa se vierte nuevamente en el embudo de separación para agregarle 10 mL de éter y se agita, se libera la presión y desechar la fase acuosa, la fase orgánica se junta con la que se colocó en el vaso de precipitado.

- 
3. A la fase orgánica colocarla en el embudo de separación y agregarle 50 mL de NaOH al 1N, agitar y decantar la fase acuosa que es la que contiene los fenoles en forma de fenolatos.
  4. Neutralizar la fase que contiene los fenolatos, es decir llevar a un pH=7 con solución de HCl 1N, ajustar a un volumen de 150 mL con agua destilada
  5. Verter la solución en el matraz de 1L y añadir 23 mL de bromuro de potasio al 25%, 10 mL de HCl al 0.5N, calentar a baño María y agitar
  6. Esperar que la solución alcance una temperatura de 50° C y añadir 25 mL de bromato de potasio al 0.3% (la solución adquiere una coloración amarillenta)
  7. Dejar en cuarto de incubación (a 28 °C) durante una hora
  8. Introducir 25ml de yoduro de potasio y dejar reposar a temperatura ambiente durante 30 min.
  9. Valorar el yodo liberado con la solución de tiosulfato de sodio 1 N, la solución pasa de rojo a transparente. Hacer lo mismo para el blanco.

#### Expresión de Resultados

$$(n_2 - n_1) * 1.567 * 1000 / V$$

Donde:

n<sub>2</sub> mL de tiosulfato utilizados para el blanco

n<sub>1</sub> mL de tiosulfato gastados en la muestra

V volumen en mL de la muestra inicial.

Nota: Los resultados se expresan en mg/L de fenol.

#### Observaciones

El tiempo de incubación es muy importante, al igual, que el tiempo en que se realiza la reacción con Yoduro de potasio.

#### Limitaciones e Interferencias

Las bacterias que descomponen los fenoles, son una fuente importante de interferencias, las cuales se eliminan al preservar adecuadamente las muestras.

Para la mayoría de las muestras se requiere una destilación preliminar, para remover las interferencias. Algunas aguas residuales altamente contaminadas pueden requerir técnicas especializadas para eliminar interferencias y para la recuperación cuantitativa de los compuestos fenólicos.

---

Agentes oxidantes: Los agentes oxidantes tales como el cloro, deben removerse inmediatamente después del muestreo mediante la adición de sulfato ferroso o arsenito de sodio en exceso. Si los agentes oxidantes no son removidos, los compuestos fenólicos podrían oxidarse parcialmente.

Un exceso de sulfato ferroso o arsenito de sodio, no interfiere ya que estos son removidos por el procedimiento de destilación.

Los sulfuros son eliminados por acidificación de la muestra con ácido sulfúrico a un pH menor de 4 y una breve aireación por medio de agitación, los compuestos que se eliminan con esta acidificación son el ácido sulfhídrico ( $H_2S$ ) y el bióxido de azufre ( $SO_2$ ).

La presencia de aceites y alquitrán pueden ser eliminados por una extracción alcalina ajustando el pH entre 12 y 12,5 con hidróxido de sodio.

Extraer los aceites y el alquitrán de la solución acuosa con 50 mL de cloroformo ( $CHCl_3$ ). Remover el exceso de cloroformo de la fase acuosa, calentando en un baño maría antes de proceder con la etapa de destilación.

### Seguridad

Cada sustancia química debe tratarse como peligro potencial a la salud. La exposición a estas sustancias debe reducirse al menor nivel posible

Los ácidos y bases concentradas empleados en este método pueden causar severas quemaduras e irritaciones en la piel, por lo que debe utilizarse ropa protectora tal como: Batas, guantes y lentes de seguridad

El Fenol es una sustancia tóxica, manipular con extremo cuidado

El laboratorio debe contar con una buena ventilación.

### Manejo de residuos

1. Los residuos de la extracción, se mandan a tratamiento de residuos de la facultad. Una vez titulada la solución se puede desechar en la tarja.

---

## **ANEXO E.**

### **DETERMINACIÓN DE NITRÓGENO TOTAL**

(NMX-AA-026-1980. Modificada a Semi-micro.Kjeldahl para aplicar a escala laboratorio)

#### Introducción

Los compuestos nitrogenados se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza. Las fuentes de nitrógeno incluyen además de la degradación natural de la materia orgánica, fertilizantes, productos de limpieza y tratamiento de aguas potables.

Debido a que el nitrógeno es un nutriente esencial para organismos fotosintéticos, es importante el monitoreo y control de descargas del mismo al ambiente.

#### Principio

En el método Kjeldahl, el nitrógeno de la mayoría de los grupos funcionales orgánicos es convertido en amonio, en la presencia de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{CuSO}_4$  (catalizador) y calor. El amoniaco libre también es convertido en amonio.

Cuando la descomposición se ha completado la disolución se enfría, se diluye y se alcaliniza con hidróxido de sodio concentrado. El amoniaco liberado se destila y se adsorbe en una disolución de concentración conocida de ácido bórico. El amonio puede ser determinado colorimetricamente, por un electrodo selectivo de amonio o por titulación con una solución ácida valorada.

Los grupos amino y amido se convierten cuantitativamente a ión amonio. Sin embargo los grupos nitro, azo o azoxi generan en las mismas condiciones, otros productos nitrogenados ( $\text{N}_2$  u óxidos de nitrógeno).

#### Reactivos

Todos los productos químicos usados en este método deben ser grado reactivo, a menos que se indique otro grado.

- *Disolución indicadora de ácido bórico* ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ): Disolver 20g de ácido bórico (secar previamente colocando el reactivo en un desecador de sílica gel por 24h) en 500 mL de agua destilada, agregar 10 mL de la mezcla de indicadores y diluir a 1 L. Guardar la

---

disolución en un envase de plástico o en un contenedor libre de boro, preparar mensualmente.

- *Disolución de tetraborato de sodio (0.025M):* 9.5 g de tetraborato de sodio decahidratado ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ) en 1L de agua.
- *Disolución amortiguadora de boratos:* Añada 88 mL de la disolución de NaOH 0.1N a 500 mL de disolución de tetraborato de sodio 0.025M y diluya a 1 L en un matraz aforado.
- *Disolución de hidróxido de sodio (0.1N).* Pesar aproximadamente 4 g de hidróxido de sodio (NaOH) y disolver en 500 mL de agua, dejar enfriar a temperatura ambiente y llevar a 1 L.
- *Disolución valorada de ácido sulfúrico (0.02N).* Preparar una disolución de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) aproximadamente 0.1N diluyendo 3 mL de ácido sulfúrico concentrado en 1 L de agua. Diluir 200 mL de esta disolución en 1 L de agua. Titular el ácido sulfúrico aproximadamente 0.02N con carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), pesando aproximadamente y con precisión 0.0318 g de carbonato de sodio anhidro, secado en horno a 140 °C. Calcular la normalidad exacta de la disolución (1 mL = 0.28 mg de N-amoniaco).
- *Mezcla de indicadores.* Pesar aproximadamente 200 mg de indicador rojo de metilo aforar a 100 mL con alcohol etílico ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ). Pesar aproximadamente 100 mg de indicador azul de metileno y aforar a 50 mL con alcohol etílico. Mezclar las dos disoluciones en un frasco de vidrio. Preparar mensualmente.
- *Reactivo para la digestión.* Pesar aproximadamente y con precisión 134 g de sulfato de potasio ( $\text{K}_2\text{SO}_4$ ) y 7.3 g de sulfato de cobre (II) anhidro ( $\text{CuSO}_4$ ) disolver en 800 mL de agua destilada libre de amoníaco, agregar cuidadosamente 134 mL de ácido sulfúrico concentrado. Dejar enfriar a temperatura ambiente y diluir la mezcla a 1 L con agua. Almacenar la disolución a una temperatura de 20°C para evitar la cristalización.
- *Disolución reactivo de hidróxido - tiosulfato de sodio.* Pesar aproximadamente y con precisión 500 g de hidróxido de sodio y 25 g de tiosulfato de sodio pentahidratado ( $\text{Na}_2\text{SO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) disolver en agua libre de amoníaco y llevar a 1 L.
- *Disolución de hidróxido de sodio (6N).* Pesar aproximadamente 240 g de hidróxido de sodio y llevar a 1 L con agua libre de amoníaco.
- *Disolución madre de amonio (1 mL = 1 mg de nitrógeno amoniacal).* Pesar aproximadamente y con precisión 3.819 g de cloruro de amonio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) y aforar a 1 L con agua.



- 
- *Disolución patrón de amonio (1 mL = 0.01 mg de nitrógeno amoniacal).* Tomar una alícuota de 10 mL de la disolución madre de amonio y aforar a 1 L con agua.

### Equipo y Materiales

Digestor con sistema de extracción de humos y destilador con sistema de condensación para mantener la temperatura por abajo de 29°C. La parrilla de calentamiento debe ser capaz de suministrar una temperatura de 375 a 385°C para una digestión efectiva.

Todo el material usado en esta determinación debe ser exclusivo para este procedimiento. Para el lavado del material remojar durante 1 h en una disolución de ácido sulfúrico al 10 % y enjuagar con agua desionizada. Los detergentes con base de hidróxido de amonio o amoniaco no deben usarse para la limpieza del material. Su uso debe restringirse dentro del laboratorio.

- Frasco de polietileno o vidrio con tapa de 2 L de capacidad
- Matraz tipo Kjeldahl de 800 mL
- Bureta con pinzas
- Matraz Erlenmeyer 250 mL
- Vaso de precipitado
- Probeta 50 mL

### Recolección, preparación y almacenamiento de muestras

- a) Deben tomarse un mínimo de 2.0 L de muestra en un envase de polietileno. Pueden utilizarse muestras compuestas o simples.
- b) Debe preservarse la muestra con ácido sulfúrico a un pH de 1.5 a 2.0. Posteriormente mantener a 4 °C hasta su análisis.
- c) El tiempo máximo de almacenamiento previo al análisis es de 7 días.

### Procedimiento

1. Limpiar el equipo de destilación antes de utilizarlo, destilando una mezcla (1:1) agua-disolución hidróxido - tiosulfato de sodio hasta que el destilado esté libre de amonio. Repetir esta operación cada vez que el equipo se vaya a utilizar, si no se emplea en intervalos de menos de 4 h también se requiere realizar esta operación.
2. Selección de volumen de muestra: Determinar el volumen de la muestra de acuerdo a la siguiente lista:

Cantidad de nitrógeno en la muestra (mg / L)	Volumen de muestra necesario (mL)
4-40	50
8-80	25
20-200	10
40-400	5

Si es necesario, ajustar el volumen aproximadamente 50 mL y neutralizar a pH 7. Colocar la muestra medida en un matraz Kjeldahl de 100 mL.

- Tomar una muestra dependiendo de las concentraciones esperadas, de acuerdo a la tabla 1 diluir con agua hasta 50 mL. Preparar un blanco con 50 mL de agua y darle el mismo tratamiento que a la muestra.
- Añadir 3 mL de la disolución amortiguadora de boratos y ajustar el pH a 9.5 con disolución de hidróxido de sodio 6N utilizando potenciómetro o papel indicador para verificar. Transferir la disolución a un matraz Kjeldahl y añadir unas cuentas de vidrio o perlas de ebullición.
- Conectar el matraz Kjeldahl al bulbo del aparato de destilación, destilar la muestra cuidando que la temperatura del condensador no pase de 302 K (29 °C), recolectando el condensado con la punta del tubo del refrigerante sumergido en 50 mL de la disolución amortiguadora de boratos.
- La destilación se completa cuando se hayan recolectado 150 mL de destilado aproximadamente, incluyendo los 50 mL de la disolución amortiguadora de Boratos con la disolución mezcla de indicadores.
- Retirar el matraz colector y titular con solución de ácido sulfúrico 0.02N hasta que la solución vire de un verde esmeralda a morado.

### Expresión de Resultados

Usar la siguiente ecuación para calcular la concentración de nitrógeno total ( $N_t$ ):

$$\text{mg } N_{tK} / L = (A-B) (N) (14) (1\ 000) / V$$

Donde:

- A son los mL de ácido sulfúrico gastados en la titulación de la muestra;
- B son los mL de ácido sulfúrico gastados en el blanco;
- N es la normalidad del ácido sulfúrico;
- V son los mL de muestra, y
- 14 es el peso equivalente del nitrógeno.

---

### Limitaciones e Interferencias

- Nitratos: Durante la digestión, el nitrato en concentraciones por arriba de 10 mg/L puede oxidar parte del amoníaco liberado produciendo  $N_2O$  y dando lugar a una interferencia negativa. Cuando se encuentre presente materia orgánica reductora, el nitrato puede reducirse a amoníaco, resultando una interferencia positiva.
- Durante la digestión, puede haber pérdidas de nitrógeno por pirólisis.
- Materia orgánica: Durante la digestión, el  $H_2SO_4$  oxida la materia orgánica a  $CO_2$  y  $H_2O$ . Si estuviera presente una gran cantidad de materia orgánica, se consume mucho ácido, aumentar la proporción de sal-ácido y aumentar la temperatura de digestión.
- Dado que los reactivos pueden contener trazas de amoníaco, trate el blanco de reactivos igual que las muestras.

### Seguridad

- Cada sustancia química debe tratarse como peligro potencial a la salud. La exposición a estas sustancias debe reducirse al menor nivel posible
- Cuando se trabaje con cualquiera de los compuestos químicos descritos en este método, debe usar todo el tiempo equipo de seguridad, tal como: batas, guantes de látex y lentes de seguridad.

### Manejo de residuos

Los residuos generados de éste método se almacenan en envases de plástico o vidrio con tapa para su posterior tratamiento en el departamento correspondiente de la Facultad de Química en la UNAM.

---

## **ANEXO F.**

### **DETERMINACIÓN DE IÓN SULFATO**

(Modificación al Método Turbidimétrico establecido en la norma NMX-AA-074-1981 para ser aplicado a escala laboratorio)

#### Introducción

Estos métodos son aplicables para la determinación del ión sulfato en aguas naturales y residuales con un ámbito de aplicación de 10 a 100 mg/L para el método gravimétrico, en este método puede ampliarse el ámbito, ajustando la cantidad de la muestra, y de 10 a 60 mg/L para el método turbidimétrico que se aplica cuando se requiere una determinación rápida de rutina o control de aguas industriales. (Ambos métodos expresados como  $\text{SO}_4^{2-}$ ).

#### Principio

El ión sulfato precipita con cloruro de bario, en un medio ácido (HCl), formando cristales de sulfato de bario de tamaño uniforme. La absorción espectral de la suspensión del sulfato de bario se mide en un espectrofotómetro. La concentración de ión sulfato se determina por comparación de la lectura con una curva patrón.

#### Reactivos

- Reactivo acondicionador. Mezclar 50 mL de glicerol, 30mL de HCl concentrado, 300 mL de agua, 100mL de alcohol etílico al 95% y 75g de NaCl.
- Cloruro de bario ( $\text{BaCl}_2$ ) en cristales.
- Solución estándar de sulfato (1.00 mL = 100  $\mu\text{g}$  de  $\text{SO}_4^{2-}$ ). Aforar a 100mL 10.41mL de solución estándar de ácido sulfúrico 0.0200N o disolver en agua 147.9 mg de sulfato de sodio anhidro y aforar a 1L.

#### Equipos y Materiales

- Espectrofotómetro UV/VIS para usarse a 420nm.
- Celda de cuarzo.
- Cronómetro.
- Bórtex.
- Micropipeta de 1000 microlitros
- Tubos de ensayo 16 x 150
- Pipetas de 10 mL

---

## Recolección, preparación y almacenamiento de muestras

La muestra debe mantenerse en refrigeración desde su toma y hasta su análisis.

## Procedimiento

### Preparación de la curva de calibración

- Estimar la concentración del ión sulfato en la muestra, comparando la lectura de turbiedad con una curva de calibración preparada con el uso de los patrones de sulfato, durante todo el procedimiento.
- Espaciar los patrones a incrementos de 5 mg/L en los límites de 0 a 40 mg/L de sulfato. Arriba de 40 mg/L, decrece la exactitud del método y pierden estabilidad las suspensiones de sulfato de bario.

### Determinación de sulfato

- Colocar 10 mL de muestra en un tubo de ensayo.
- Añadir 1 mL de reactivo acondicionador y mezclar bien.
- Agregar 0.5 g de BaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O y empezar a medir el tiempo inmediatamente. Agitar en bórtez durante un minuto exacto a una velocidad constante.
- Inmediatamente después de terminar el período de agitación, verter algo de la solución a la celda de absorción y medir la turbiedad a los 3 minutos (contando el minuto de agitación).
- Correr un blanco sin cloruro de bario para corregir por color y turbiedad presentes en la muestra original

### Expresión de Resultados

El contenido del ión sulfato en mg/L, se conoce aplicando la fórmula siguiente:

$$\text{mg/L SO}_4^{2-} = \frac{\text{mg SO}_4 \times 1000}{\text{mL de muestra}}$$

### Observaciones

Dependiendo de la cantidad de sulfatos esperada en la muestra, se debe proceder a realizar las diluciones necesarias para obtener valores del ión que caigan aproximadamente a la mitad del rango establecido para la curva de calibración.

---

La precisión de este método depende de las interferencias presentes y de la habilidad del analista. Cuando no hay interferencias y se efectúa un análisis cuidadoso, puede obtenerse una precisión del 5% de sulfatos ó 2 mg/L.

#### Limitaciones e Interferencias

En este método, interfieren la materia en suspensión en grandes cantidades y el color. La materia suspendida puede eliminarse parcialmente por filtración.

La sílice en concentración de 500 mg/L y la materia orgánica en concentraciones altas, también interfieren, imposibilitando la precipitación satisfactoria del sulfato de bario.

En aguas normales, no existen otros iones además del sulfato, que formen compuestos insolubles con bario, bajo condiciones fuertemente ácidas. Efectuar las determinaciones a temperatura ambiente, con una variación del orden de  $\pm$  diez grados, no causa error apreciable.

#### Manejo de residuos

Todas las muestras que cumplan con la norma de descarga al alcantarillado pueden ser descargadas en el mismo. En caso contrario se enviarán en envases de vidrio bien tapados al departamento correspondiente de la Facultad de Química, UNAM, para su posterior tratamiento.

---

## **ANEXO G.**

### **DETERMINACIÓN DE SULFUROS**

(Modificación al Método Yodométrico establecido en la norma NMX-AA-084-1982 para ser aplicado a escala laboratorio)

#### Introducción

El método descrito es aplicable a aguas naturales, residuales y estuarinas. Es útil si el contenido de sulfuros es mayor de 1 mg/L; éste método se usa para aguas residuales y aguas que oxidan parcialmente el azufre y que están libres de interferencias.

#### Principio

El método iodométrico se efectúa a partir de una titulación basada en la reacción del iodo con el sulfuro en solución ácida, oxidándolo hasta azufre.

#### Reactivos

- Solución de ácido clorhídrico HC1 6N.
- Solución estándar de iodo 0.025N. De 20 a 25 g de KI se disuelven en agua y se añaden 3.2 g de iodo, después de que éste se haya disuelto, diluir a un litro y valorarlo con solución de tiosulfato de sodio 0.0250N, usando almidón como indicador.
- Solución estándar de tiosulfato de sodio 0.0250N. Disolver 6.205 g de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  en agua, adicionar 1.5 mL de solución de NaOH 6N ó 0.4 g de NaOH sólido y diluir a un litro. Titular con solución de bi-yodato de potasio.
- Solución estándar de bi-yodato de potasio, 0.0250N. Disolver 812.4 mg de  $\text{KH}(\text{IO}_3)_2$  en agua y diluir a un litro.
- Solución de almidón. Disolver 2 g de almidón soluble y como preservador 0.2 de ácido salicílico, en 100 mL de agua.

#### Materiales

- Matraz Erlenmeyer 125 mL, y 500mL
- Pipeta graduada 10mL y 5 mL

- Bureta con pinza
- Probeta 50mL
- Vaso de precipitado
- Embudo de filtración rápida
- Papel filtro

### Recolección, preparación y almacenamiento de muestras

Las muestras deben ser tomadas con una aireación mínima. Para determinar sulfuros totales, la muestra debe preservarse a 4° C, con 4 gotas de solución de acetato de zinc 2 N por cada 100mL de muestra adicionadas antes de llenar totalmente el frasco.

### Procedimiento

- En un frasco de 500 mL se mide con bureta una cantidad de yodo en solución, tal que exceda a la concentración de sulfuros presentes. Si es necesario se adiciona agua para completar a 20 mL. Agregar 2 mL de solución de HC1 6N. Medir con pipeta 200 mL de muestra y descargar bajo la superficie de la solución que contiene el yodo. Si el color de éste desaparece, adicionar más yodo, hasta que permanezca su coloración. Titular con solución valorada de tiosulfato de sodio y almidón como indicador, hasta desaparecer el color azul.
- Si el sulfuro se precipitó con zinc y se filtró el ZnS, el filtro con el precipitado debe regresarse a la botella original y adicionar 100 mL de agua. Añadir HC1 y la solución de yodo y titular con tiosulfato de sodio.

### Expresión de Resultados

Si un mL de la solución de yodo 0.0250 N reacciona con 0.4 mg de sulfuro, luego:

$$\text{mg/L} = \frac{[(A \times B) - (C \times D)] \times 16,000}{\text{mL de la muestra.}}$$

A = mL Solución de yodo

B = Normalidad de la solución de yodo

C = mL Tiosulfato de sodio

D = Normalidad del tiosulfato de sodio.

### Limitaciones e Interferencias



---

El método iodométrico adolece de interferencias como las sustancias reductoras que reaccionan con el yodo, incluyendo sulfitos, tiosulfatos y varios compuestos orgánicos, sean sólidos o estén disueltos.

Las interferencias debido a sulfitos, tiosulfatos, yoduros y muchas otras sustancias solubles, exceptuando ferrocianuros, se eliminan adicionando sulfuro de zinc, removiendo el sobrenadante y reemplazándolo por agua. Este mismo procedimiento se usa para concentrar los sulfuros, incluso si no hay necesidad de remover las interferencias.

### Manejo de residuos

Todas las muestras que cumplan con la norma de descarga al alcantarillado pueden ser descargadas en el mismo. En caso contrario se enviarán en envases de vidrio bien tapados al departamento correspondiente de la Facultad de Química, UNAM, para su posterior tratamiento.

---

## **ANEXO H.**

### **DETERMINACIÓN DE DBO<sub>5</sub>** (NMX-AA-028-1981, Método Yodométrico)

#### Introducción

Demanda bioquímica de oxígeno (DBO<sub>5</sub>): es una estimación de la cantidad de oxígeno que requiere una población microbiana heterogénea para oxidar la materia orgánica de una muestra de agua en un periodo de 5 días. El método se basa en medir el oxígeno consumido por una población microbiana en condiciones en las que se ha inhibido los procesos fotosintéticos de producción de oxígeno en condiciones que favorecen el desarrollo de los microorganismos.

#### Principio

El método se basa en medir la cantidad de oxígeno que requieren los microorganismos para efectuar la oxidación de la materia orgánica presente en aguas naturales y residuales y se determina por la diferencia entre el oxígeno disuelto inicial y el oxígeno disuelto al cabo de 5 días de incubación a 20° C.

#### Reactivos

- Ácido clorhídrico (HCl), Nítrico (HNO<sub>3</sub>) y sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) concentrados.
- Disolución amortiguadora de fosfato. Pesar 8,5 g de fosfato monobásico de potasio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), 21,75 g de fosfato dibásico de potasio (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), 33,4 g de fosfato dibásico de sodio heptahidratado (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O) y 1,7 g de cloruro de amonio (NH<sub>4</sub>Cl), disolver en 500 mL de agua y aforar a 1 L. El pH de la disolución debe ser de 7,2. Desechar el reactivo (o cualquiera de los siguientes reactivos) si hay algún signo de crecimiento biológico en el frasco de almacenamiento.
- Disolución de sulfato de magnesio (MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O). Pesar aproximadamente 22,5 g de sulfato de magnesio heptahidratado, disolver en agua y diluir a 1 L.
- Disolución de cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>). Pesar 27,5 g de cloruro de calcio anhidro, disolver en agua y diluir a 1 L.
- Disolución de cloruro férrico (FeCl<sub>3</sub>•6H<sub>2</sub>O). Pesar aproximadamente 0,25 g de cloruro férrico hexahidratado, disolver en agua y diluir a 1 L.
- Disolución de ácido sulfúrico (0,1N). Agregar aproximadamente 2,8 mL de ácido sulfúrico concentrado (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) a 500 mL de agua, mezclar bien y diluir hasta 1 L.

- 
- Disolución de hidróxido de sodio (0,1N). Pesar aproximadamente 4,0 g de hidróxido de sodio (NaOH), disolver en agua y diluir a 1 L.
  - Disolución de cloruro de amonio. Pesar aproximadamente 1,15 g de cloruro de amonio (NH<sub>4</sub>Cl) y disolver en 500 mL de agua, ajustar el pH a 7,2 con disolución de hidróxido de sodio y aforar a 1 L. La disolución contiene 0,3 mg N/mL
  - Disolución de sulfato manganoso (MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O o MnSO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O o MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O). Disolver en agua 480 g de sulfato manganoso, filtrar y diluir a 1 L. Esta disolución debe usarse siempre y cuando no de color al adicionarle una disolución ácida de yoduro de potasio en presencia de almidón.
  - Disolución alcalina de yoduro-azida de sodio. Disolver en agua 500 g de hidróxido de sodio (NaOH), 700 g de hidróxido de potasio (KOH) y 150 g de yoduro de potasio (KI), diluir a 1 L con agua destilada. A esta disolución agregar 10 g de azida de sodio (NaN<sub>3</sub>) disueltos en 40 mL de agua. Esta disolución no debe dar color con la disolución de almidón cuando se diluya y acidifique.
  - Disolución indicadora de almidón. Disolver en 1L de agua destilada caliente, 20g de almidón soluble y 2g de ácido salicílico como conservador. Mantener en refrigeración siempre que no esté en uso.
  - Disolución estándar de tiosulfato de sodio (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O) Pesar aproximadamente 6,205g de tiosulfato de sodio y disolver en agua destilada y diluir a un litro; agregar un gramo de hidróxido de sodio en lentejas. Se debe calcular la concentración de esta disolución con una disolución de biyodato de potasio 0,002 1 M o con una disolución de dicromato de potasio 0,025 N, usando la disolución de almidón como indicador (1 mL de la disolución valorada de tiosulfato 0,025 M es equivalente a 1mg de oxígeno disuelto).
  - Disolución de biyodato de potasio (0,002 1M). Pesar aproximadamente y con precisión 812,4 mg de biyodato de potasio (KH(IO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) y aforar a 1L con agua destilada.
  - Disolución de dicromato de potasio (0,025 N). Pesar aproximadamente y con precisión 1,226g de dicromato de potasio (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) previamente secado a 105° C durante 2 h y aforar a 1L con agua destilada.
  - Valoración de la disolución de tiosulfato de sodio. En un matraz Erlenmeyer, disolver 1g de yoduro de potasio exento de yodato en 60 mL de agua. Agregar 0,5 mL de ácido sulfúrico concentrado y 10 mL de la disolución de dicromato de potasio o biyodato de potasio, diluir a 100 mL con agua y valorar el yodo con la disolución de tiosulfato, agregar el almidón hasta el final de la determinación, cuando se alcance un color amarillo pálido.

$$N \text{ de tiosulfato} = \frac{V(\text{KH}(\text{IO}_3)_2) \times N(\text{KH}(\text{IO}_3)_2)}{\text{mL gastados de tiosulfato}}$$

Donde: **N** es la normalidad y **V** es el volumen.

---

## Materiales

Todo el material usado en la determinación debe ser exclusivo para este procedimiento. Para el lavado del material remojar durante 1 h en una disolución de ácido sulfúrico al 10 % y enjuagar con agua. Los detergentes con base de amoníaco no deben usarse para la limpieza del material.

Los contenedores de las muestras deben lavarse con disolución de detergente no iónico, libre de metales, enjuagarse con agua, remojar en ácido toda la noche y volver a enjuagarse con agua libre de metales.

Para el material de cuarzo, politetrafluoroetileno o material de vidrio debe dejarse remojando de 12 h a 24 h con  $\text{HNO}_3$  (1:1) o  $\text{HCl}$  (1:1), después debe ser enjuagado con agua libre de metales.

En los casos de que el material presente grasas, enjuagar con acetona y/o hexano.

- Incubador: Controlado por termostato a  $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ . Eliminar toda la luz para evitar la posibilidad de producción fotosintética de oxígeno disuelto.
- Botellas Winkler de vidrio para incubación con capacidad de 300 mL de aforo total y con boca estrecha, reborde y tapón de vidrio esmerilado, de forma cónica.
- Contratapa de politetrafluoroetileno u otro material plástico para botella Winkler
- Bureta
- Matraz Erlenmeyer 250mL
- Micropipeta 10-1000 microlitros

## Recolección, preparación y almacenamiento de muestras

En el caso de aguas naturales debe tomarse un mínimo de 1L de muestra en un envase de polietileno o vidrio. En el caso de aguas residuales ( $\text{DBO}_5$  mayores a 50 mg/L) deben tomarse mínimo 100 mL. Pueden utilizarse muestras simples o compuestas.

El tiempo máximo de almacenamiento previo al análisis es de 24 h. No se debe agregar ningún preservador a las muestras. Solo deben conservarse a  $4^\circ\text{C}$  hasta su análisis.

Se debe evitar que la muestra se agite o entre en contacto con el aire.

### *Preparación de agua para dilución*

Añadir por cada litro de agua destilada 1 mL de cada una de las siguientes disoluciones: disolución de sulfato de magnesio, disolución de cloruro de calcio, disolución de cloruro férrico y disolución amortiguadora de fosfatos. Preparar el agua de dilución diariamente.

---

Saturar con oxígeno aireando con aire filtrado durante 1 hora por lo menos.

### *Inóculo*

Es necesario contar con una población de microorganismos capaces de oxidar la materia orgánica biodegradable de la muestra. El agua residual doméstica, los efluentes no clorados o sin desinfección, los efluentes de las plantas de tratamiento de desechos biológicos y las aguas superficiales que reciben las descargas de aguas residuales que contienen poblaciones microbianas satisfactorias.

### *Pre-tratamiento de la muestra*

Neutralizar las muestras a un pH entre 6,5 y 7,5 con ácido sulfúrico o hidróxido de sodio de concentración tal que la cantidad de reactivo no diluya la muestra en más del 0,5 %. El pH del agua de dilución sembrada no debe verse afectado por la dilución de la muestra.

### *Técnica de dilución*

Las diluciones que dan lugar a un OD residual mayor de 1 mg/L y una captación de OD de al menos 2 mg/L después de 5 días de incubación, producen los resultados más confiables. Hacer varias diluciones (al menos 3) por duplicado de la muestra preparada para obtener una captación de OD en dicho intervalo. La experimentación con una muestra concreta permite el uso de un número menor de diluciones. Un análisis más rápido tal como la DQO, presenta una correlación aproximada con la DBO<sub>5</sub> y sirve como una guía para seleccionar las diluciones. En ausencia de datos previos, utilizar las siguientes diluciones: de 0 % a 1 % para los residuos industriales fuertes, de 1 % a 5 % para las aguas residuales sedimentadas y crudas, del 5 % al 25 % para el efluente tratado biológicamente y del 25 % al 100 % para las aguas superficiales contaminadas.

Diluciones preparadas directamente en frascos tipo Winkler. Utilizando una pipeta volumétrica, añadir el volumen de muestra deseado a frascos Winkler individuales de 300 mL. Añadir cantidades adecuadas del material de siembra a los frascos tipo Winkler o al agua de dilución. Llenar los frascos con suficiente agua de dilución, sembrada si es necesario, de forma que la inserción del tapón desplace todo el aire, sin dejar burbujas. No realizar diluciones mayores de 1:300 (1 mL de la muestra en un frasco). Determinar el OD inicial en uno de los frascos de cada una de las diferentes diluciones. En los frascos de los duplicados de cada una de las diluciones, Ajustar herméticamente el tapón, poner un sello hidráulico y la contratapa e incubar durante 5 días a 20° C.

Determinación del OD inicial

---

## Procedimiento

1. Fijar el oxígeno adicionando a la botella tipo Winkler que contiene la muestra, 2mL de sulfato manganoso y 2mL de la disolución alcalina de yoduro-azida.
2. Tapar la botella tipo Winkler, agitar vigorosamente y dejar sedimentar el precipitado.
3. Añadir 2mL de ácido sulfúrico concentrado, volver a tapar y mezclar por inversión hasta completa disolución del precipitado.
4. Titular 100mL de la muestra con la disolución estándar de tiosulfato de sodio 0.025M agregando el almidón hasta el final de la titulación, cuando se alcance un color amarillo pálido.
5. Continuar hasta la primera desaparición del color azul.

### *Determinación del OD final*

Después de 5 días de incubación determinar el OD en las diluciones de la muestra, en los controles y en los blancos. La medición del OD debe ser realizada inmediatamente después de destapar la botella de Winkler, para evitar la absorción de oxígeno del aire por la muestra.

## Expresión de Resultados

$$\text{OD mg/L} = (M \times \text{mL de Tiosulfato} \times 8 \times 1\,000) / 98,7$$

Donde: M = es la molaridad de tiosulfato  
8 = son los gramos/ equivalente de oxígeno  
98,7 = es el volumen corregido por el desplazamiento de los reactivos.

Cuando no se utilice inóculo ni diluciones:

$$\text{DBO}_5 \text{ (mg/L)} = \text{ODi mg/L} - \text{OD}_5 \text{ mg/L}$$

Donde: ODi mg/L es el oxígeno disuelto inicial, y  
OD<sub>5</sub> mg/L es el oxígeno disuelto al quinto día

Cuando se emplea una dilución:

$$\text{DBO}_5 \text{ (mg/L)} = \frac{\text{ODi mg/L} - \text{OD}_5 \text{ mg/L}}{\% \text{ de dilución expresado en decimales}}$$

## Observaciones

Si la muestra presenta alto contenido de biocidas como cloro o se sabe de su bajo contenido de materia orgánica, es necesario inocular la muestra.

---

### Limitaciones e Interferencias

- El pH ácido o alcalino
- Cloro residual
- Nitritos y sustancias oxidantes, inorgánicas y orgánicas reductoras.
- Introducción de burbujas de aire en la muestra.

### Seguridad

La preparación de todos los reactivos usados en este método debe efectuarse bajo una campana de extracción. Consulte las hojas de seguridad sobre manipulación y disposición de éstos.

### Tratamiento de Residuos

Los desechos ácidos se deben neutralizar para su posterior desecho.

Todas las muestras que cumplan con la norma de descarga al alcantarillado pueden ser descargadas en el mismo.

---

## **ANEXO I.**

### **DETERMINACIÓN DE COLIFORMES TOTALES**

(NMX-AA-042-1987. Modificada)

#### Introducción

La presencia y extensión de contaminación fecal es un factor importante en la determinación de la calidad de un cuerpo de agua. Las heces contienen una variedad de microorganismos y formas de resistencia de los mismos, involucrando organismos patógenos, los cuales son un riesgo para la salud pública al estar en contacto con el ser humano. El examen de muestras de agua para determinar la presencia de microorganismos del grupo coliforme que habitan normalmente en el intestino humano y de otros animales de sangre caliente, da una indicación sensible de dicho tipo de contaminación fecal. Dada la limitada capacidad de algunos miembros del grupo de organismos coliformes para sobrevivir en agua; sus números también pueden emplearse para estimar el grado de contaminación fecal. Los organismos coliformes comprenden a todos los bacilos aerobios o anaerobios facultativos Gram negativos, no esporulados que fermentan la lactosa a 35 a 37 ° C con producción de gas y ácido en un periodo de 24 a 48 horas. El NMP (número más probable) es una expresión estadística que se utiliza para estimar la cantidad de bacterias coliformes presentes en un volumen de muestra determinado.

#### Principio

El método se basa en la inoculación de alícuotas de la muestra diluida o sin diluir, en una serie de tubos de un medio de cultivo líquido conteniendo lactosa.

Los tubos se examinan a las 24 y 48 horas de incubación ya sea a 35 a- 37°C. Cada uno de los que muestren turbidez con producción de gas se considera positivo. Mediante tablas estadísticas, se lleva a cabo el calculo del numero más probable (NMP) de organismos coliformes totales que puedan estar presentes en 100 mL de muestra a partir del número de tubos que den resultados confirmativos positivos

#### Reactivos

Los reactivos que a continuación se mencionan, deben ser grado analítico o grado bacteriológico a menos que se indique otra cosa.



---

Para la preparación de los reactivos, las condiciones de esterilización deben de ser 121°C durante 15 minutos. Los tubos de fermentación (tipo Durham) no deben contener burbujas después de la esterilización.

Medio de Cultivo: Caldo Lactosa.

*Medio doble de concentración:*

Peptona 10.0 g

Lactosa 10.0 g

Extracto de carne 6.0 g

Agua para llevar a 1000 mL

Disolver los componentes en agua hirviendo

Si es necesario, ajustar el pH de modo que al terminar la esterilización sea de 6.7.

*Medio simple concentración:* Diluir el medio de doble concentración con un volumen igual de agua.

Distribuir el medio de simple concentración en volúmenes de 5 mL y el de doble concentración en volúmenes de 10 y 50 mL. Cada tubo o matraz debe contener un tubo de fermentación invertido (tipo Durham). Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.

### Materiales

Aparte de los materiales que se suministran estériles, el material de vidrio y el resto del equipo deben esterilizarse.

- Incubadora de temperatura para 35-37 °C.
- Parrilla de calentamiento.
- Autoclave.
- Medidor de pH
- Pipetas graduadas
- Tubos de fermentación (tipo Durham)
- Asas de inoculación
- Material de uso común en laboratorio

### Recolección, preparación y almacenamiento de muestras

---

Durante el período que transcurre del muestreo al análisis, se debe conservar la muestra a 4 +/- 1° C, con objeto de inhibir la actividad bacteriana.

### Procedimiento

1. Mezclar perfectamente la muestra agitándola vigorosamente para lograr una distribución uniforme de los microorganismos y, dependiendo de la naturaleza del agua y el contenido bacteriano esperado, hacer todas las diluciones necesarias en esta etapa.
2. Utilizar series que consten de por lo menos tres diluciones por ejemplo: 10 mL, 1.0 mL y 0.1 mL o bien 1.0 mL, 0.1 mL y 0.01 mL o las que se consideren necesarias. Por cada dilución debe haber 3 ó 5 tubos.
3. Inocular los tubos conteniendo medios de aislamiento de doble concentración con porciones de prueba de un volumen mínimo de 5mL.
4. Inocular los tubos conteniendo medios de aislamiento de simple concentración con los volúmenes inferiores a 5 mL.
5. Incubar los tubos inoculados a 35°C -37 °C durante 48 h.
6. Después de un periodo de incubación de 18 a 24 horas considerar como resultados positivos aquellos tubos que muestren turbidez debido al crecimiento bacteriano y formación de gas en los tubos internos invertidos (Tipo Durham) junto con producción de ácido si el medio de aislamiento contiene un indicador de pH.
7. Reincubar aquellos tubos que no muestren alguno o todos estos cambios y examinarlos nuevamente para detectar reacciones positivas a las 48 horas.

### Expresión de Resultados

A partir del número de tubos que dan reacciones positivas en los medios presuntivos y confirmativos, calcular por referencia a las tablas estadísticas siguientes el número más probable de organismos coliformes en 100 mL de la muestra. Cuando se emplean diluciones, el resultado final deberá multiplicarse por el factor de dilución para hacerlo equivalente.

En el caso de no encontrar en las tablas la combinación de tubos adecuada, emplear para los cálculos la siguiente ecuación:

$$\text{NMP/100 ml} = \sqrt{\frac{\text{No. de tubos positivos} \times 100}{\text{ml de muestra en tubos negativos} \times \text{ml de muestra en todos los tubos}}}$$

Tabla 2. Índice del NMP y límite confiable de 95% para varias combinaciones de resultados positivos y negativos cuando se usan: 3 tubos con porciones de 10 mL, 3 tubos con porciones de 1mL y 3 tubos con porciones de 0.1mL.

No. de tubos con reacciones positivas			Índice del NMP por 100 ml	Límite confiable de 95%	
3 tubos con 10 ml	3 tubos con 1 ml	3 tubos con 0.1 ml		Inferior	Superior
0	0	0	<3		
0	0	1	3	<0.5	9
0	1	0	3	<0.5	3
1	0	0	4	<0.5	20
1	0	1	7	1	21
1	1	0	7	1	23
1	1	1	11	3	36
1	2	0	11	3	36
2	0	0	9	1	36
2	0	1	14	3	37
2	1	0	15	3	44
2	1	1	20	7	89
2	2	0	21	4	47
2	2	1	28	10	150
3	0	0	23	4	120
3	0	1	39	7	130
3	0	2	64	15	380
3	1	0	43	7	210
3	1	1	75	14	230
3	1	2	120	30	380
3	2	0	93	15	380
3	2	1	150	30	440
3	2	2	210	35	470
3	3	0	240	36	1300
3	3	1	460	71	2400
3	3	2	1100	150	4800
3	3	3	>=2400		

### Manejo de residuos

El contenido de los tubos puede desecharse en la tarja siempre y cuando sea esterilizado previamente.