



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

ESTUDIO Y APLICACION DE LA PRUEBA DE  
BIODEGRADABILIDAD AEROBIA RAPIDA  
OECD 301-A

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

KAREN TATIANA AMBRIZ RIVAS



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUIMICA

MEXICO, D. F.

1998

4  
29  
259954



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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**

<b>Presidente</b>	<b>Prof. Vélez Pratt Guadalupe</b>
<b>Vocal</b>	<b>Prof. Sveshtarova Pekarkova Biserka</b>
<b>Secretario</b>	<b>Prof. Luna Pabello Víctor Manuel</b>
<b>1er. suplente</b>	<b>Prof. Tsuzuki Reyes María Guadalupe</b>
<b>2do. suplente</b>	<b>Prof. Martín Fuentes Ruth Edith</b>

**Sitio donde se desarrolló el tema: Facultad de Química, Conjunto "E". Laboratorio 301.  
Programa de Ingeniería Química Ambiental y Química Ambiental. UNAM**

**Asesor del tema**



\_\_\_\_\_  
**Dr. Víctor Manuel Luna Pabello**

**Sustentante**



\_\_\_\_\_  
**Karen Tatiana Ambriz Rivas**

**TRABAJO PARA SER REVISADO  
POR EL JURADO**

**26 FEB. 1998**

# DEDICATORIAS

*Dedico este trabajo a:*

- ☺ *Mi madre, Mayra Rivas Alcón pues hoy puedes comenzar a recoger los frutos de tu infinito amor, dedicación y entrega, al verme culminar mis estudios profesionales. Realmente, no encuentro las palabras para expresar todo lo que siento, porque simplemente, no existen. Te adoro.*
  
- ☺ *Mi padre, Raúl Ambríz Fernández. Con tu maravilloso ejemplo me has enseñado cómo no debe ser mi futuro desarrollo profesional y me has demostrado que no hay imposibles ni obstáculos cuando se desea algo.*
  
- ☺ *Mis hermanos, Alexander y Marco Vinicio por todo lo que significan para mí. Los momentos que compartimos los tres juntos, a pesar de las pequeñas diferencias que llegamos a tener son realmente maravillosos, aparte de que... me hacen reír como loca. Gracias por apoyarme (cada uno a su manera), en todas las cosas que emprendo. Sin ustedes la vida sería extremadamente aburrida y vacía. Adicionalmente, quiero agradecer a Alexander, toda su asesoría técnica (como Ingeniero de Soporte), sin la cual hubiera sido imposible la edición de este documento*
  
- ☺ *A todos mis familiares, aunque la distancia nos separe físicamente, sé que los lazos del amor siempre nos mantendrán juntos.*
  
- ☺ *A mis amigas de toda la vida: Gaby Anaya, Erika Martínez, Gaby Martínez y Laura Sánchez. Ustedes son uno de los mayores tesoros que tengo. Gracias a cada una por ser exactamente como es conmigo, por todos los años y momentos que hemos compartido... ¡Y los que faltan!*



*A Antonio, porque eres lo más inesperado y maravilloso en mi vida. Desde aquella tarde de noviembre en que platicamos por primera vez, redescubrí cuán hermoso es tener ilusiones, creer en ellas y construir todo un futuro a base de comunicación, comprensión y realidades (aunque de repente no es fácil para ninguno de los dos ¿verdad?). Es como tener un árbol, cuidarlo amorosamente, verlo crecer y disfrutar de su presencia día con día.*









*A Roberto Gómez, porque sería imposible hablar de mis años en la Universidad sin referirme a ti; ya que siempre te consideré mi amigo y aunque nos separen unos cuantos kilómetros siempre te recordaré y podrás contar conmigo. A Néctor González, porque a pesar de lo poco que nos vemos, siento que el cariño que nació hace tantos años, ha permanecido intacto a través del tiempo. A Juan Pablo Lara, porque de una u otra manera, has estado presente en los momentos más significativos de mis años de Licenciatura*



*A todas las personas que de una u otra manera han colaborado para que yo sea tal y como soy, porque estoy segura de que sin ustedes y los momentos que compartimos, yo no sería la misma y, toda esta historia sería diferente, así que... ¡Gracias!*

## AGRADECIMIENTOS

-  *Al Dr. Víctor Manuel Luna Pabello. Gracias a tu apoyo pude iniciar esta etapa de mi vida y adentrarme a una rama de la ciencia, fascinante. Además, te agradezco toda tu atención, paciencia e interés por llegar a feliz término con este proyecto. Finalmente, gracias por no hacerme sentir como una alumna, sino como una colaboradora. Pienso que de esta manera, podremos emprender muchos nuevos proyectos.*
-  *Al Dr. Karl Bertram Nagel, por todo su apoyo e interés en la realización de este trabajo, así como por todas las oportunidades de desarrollo que me ha brindado.*
-  *A la Dra. Carmen Durán de Bazúa, por permitirme formar parte del equipo de trabajo del Programa de Ingeniería Química Ambiental y Química Ambiental.*
-  *A la Ing. Líz Elia Domínguez Cuéllar, por todas las facilidades que me ha brindado para desarrollar mi tesis y, por lo que en un futuro pueda llegar a realizar con ustedes. Al Biol. Luciano Hernández, quien me apoyó en las labores de identificación de mis queridas bacterias.*
-  *A mis sinodales, Guadalupe Vélez Pratt y Biserka Sveshtarova Pcharkova por todos sus consejos, atenciones y el tiempo que invirtieron para leer, comprender y revisar este trabajo..*
-  *A Fidel Armendáriz, mi compañero de trabajo quien me involucró en el proyecto que posteriormente me permitiría desarrollar la parte experimental de esta tesis. No sólo has sido un compañero, también un amigo y espero que en el futuro podamos seguir trabajando y compartiendo sueños. Asimismo, a Ricardo Mezu, por todo lo que me enseñaste y por los amenos ratos de trabajo que pasamos mientras desarrollábamos nuestras respectivas tesis. Finalmente, a Néctor Ramírez, Fernando Osorio, Rosario Rodríguez, Miriam Piña, Juan Manuel Arce y Beatriz Morales, que de una u otra manera han estado involucrados en este año de trabajo, ilusiones, triunfos y fracasos.*

## **REALIZACIÓN:**

El trabajo experimental de esta tesis fue desarrollado dentro del Programa de Ingeniería Química Ambiental y Química Ambiental (PIQAYQA), Laboratorio 301 del Conjunto E, Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

## **ASESOR:**

**Dr. Víctor Manuel Luna Pabello**

## **RECONOCIMIENTOS:**

El desarrollo de este trabajo fue posible gracias al apoyo de:

- Beca asignada por el Instituto Mexicano del Petróleo (IMP) a través del Programa Maestro para la formación de recursos humanos para la industria petrolera. Se hace patente, la labor desempeñada como asesora interna, por parte del IMP, de la I.Q. Liz Elia Domínguez Cuéllar, investigadora numeraria adscrita a la Gerencia de Perforación y Acondicionamiento de Pozos, dependiente de Subdirección de Explotación y Producción del IMP.
- Beca complementaria asignada por el proyecto UNAM-GTZ “Residuos Peligrosos” 1995-1998.
- Programa de Ingeniería Química Ambiental y Química Ambiental (PIQAYQA), Laboratorio 301 del Conjunto E, Facultad de Química, UNAM, que contribuyó con infraestructura y equipo.
- Cepario de la Facultad de Química, Laboratorio 1-C, Edificio A, que brindó la infraestructura requerida para la identificación de bacterias.

# ESTUDIO Y APLICACIÓN DE LA PRUEBA DE BIODEGRADABILIDAD AEROBIA RÁPIDA OECD 301-A

## ÍNDICE

	Pág
ÍNDICE DE TABLAS	I
ÍNDICE DE FIGURAS	III
RESUMEN	I
CAPÍTULO PRIMERO. INTRODUCCIÓN	3
CAPÍTULO SEGUNDO. ANTECEDENTES	9
2.1. Marco teórico de referencia	10
2.1.1. Importancia de los ciclos biogeoquímicos	10
2.1.2. Generalidades sobre crecimiento microbiano	12
2.1.2.1. Curva de crecimiento microbiano	13
2.1.3. Factores abióticos que afectan el crecimiento microbiano	16
2.1.3.1. Temperatura	16
2.1.3.2. Oxígeno	17
2.1.3.3. pH	18
2.1.3.4. Presión osmótica	19
2.1.3.5. Elementos traza y factores de crecimiento orgánicos	20
2.1.3.6. Presencia de sustancias tóxicas	21
2.1.3.7. Potencial de oxidorreducción	22
2.2. Aspectos generales sobre biodegradación	22
2.2.1. Concepto de biodegradación y términos relacionados	22
2.2.2. Demanda bioquímica de oxígeno	25
2.2.3. Métodos para la cuantificación de la demanda bioquímica de oxígeno	27
2.2.4. Pruebas de biodegradabilidad	29



	<b>Pág</b>
2.2.4.1. Procedimiento general	30
2.2.5. Clasificación de pruebas de biodegradabilidad	32
2.2.6. Pruebas de biodegradabilidad aerobia rápida	34
2.3. Aguas agroindustriales. Caso de estudio: Aguas residuales del ensilado y prensado del cempasúchil pretratadas anaerobiamente	47
2.3.1. Generalidades sobre la flor de muerto o cempasúchil	47
2.3.2. Aguas residuales provenientes del ensilado y prensado del cempasúchil	49
2.3.3. Consecuencias ambientales	51
2.3.4. Biodegradabilidad de efluentes	52
2.4. Justificación	53
CAPÍTULO TERCERO. OBJETIVOS Y ESTRATEGIA DE TRABAJO	54
3.1. Objetivo general	55
3.2. Objetivos específicos	55
3.3. Estrategia de trabajo	56
CAPÍTULO CUARTO. ETAPA EXPERIMENTAL PREVIA	59
4.1. Material y métodos	60
4.1.1. Preparación de la muestra de agua residual en estudio y obtención del inóculo	60
4.1.2. Montaje de la prueba	61
4.1.3. Evaluación de parámetros fisicoquímicos del agua residual en estudio	61
4.1.4. Análisis bacteriológico del agua residual en estudio	62
4.2. Resultados y discusión	64

	<b>Pág</b>
<b>CAPÍTULO QUINTO. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>78</b>
5.1. Aplicación de la prueba de biodegradabilidad aerobia rápida OECD 301-A a las aguas residuales del ensilado y prensado del cempasúchil pretratadas anaerobiamente	79
5.1.1. Preparación de las muestras a evaluar y del inóculo microbiano	79
5.1.2. Modificaciones realizadas a los procedimientos previamente consultados	81
5.1.3. Parámetros fisicoquímicos complementarios a evaluar durante la aplicación de la prueba OECD 301-A	83
5.1.4. Análisis bacteriológico a realizar durante la aplicación de la prueba OECD 301-A	83
5.1.5. Montaje usando el procedimiento indicado en la prueba OECD 301-A	84
5.1.6. Montaje usando el respirómetro automático VOITH Sapromat B-12	85
5.1.7. Tipificación de las colonias bacterianas seleccionadas	85
<b>CAPÍTULO SEXTO. RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN</b>	<b>88</b>
6.1. Prueba de biodegradabilidad aerobia OECD 301-A no modificada	89
6.2. Prueba de biodegradabilidad aerobia OECD 301-A modificada	103
6.3. Análisis comparativo de ambos procedimientos	118
<b>CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b>	<b>135</b>
7.1. Conclusiones	136
7.2. Recomendaciones	
<b>CAPÍTULO 8. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>142</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>148</b>
Anexo A. Pruebas de biodegradabilidad aerobia rápida consultadas	149

	<b>Pág</b>
A.1.OECD 301A “ Prueba de desaparición de carbono orgánico disuelto”	149
A.2. ISO 7827 1994 (E). Evaluación en medio acuoso de la biodegradabilidad aerobia última de compuestos orgánicos. Método por análisis de carbono orgánico disuelto	160
Anexo B. Guía para la operación del equipo VOITH-Sapromat B-12	172
B.1. Calibración de equipo VOITH-Sapromat B-12 con sulfito de sodio	179
Anexo C. Tablas de valores obtenidos de la aplicación de las pruebas	180
Anexo D. Técnicas fisicoquímicas complementarias	187
D.1. Determinación de demanda química de oxígeno (DQO)	187
D.2. Determinación de carbono orgánico disuelto (COD)	190
D.3. Determinación de oxígeno disuelto (OD)	191
D.4. Determinación de sólidos	192
D.5. Determinación de ortofosfatos	197
Anexo E. Técnicas microbiológicas	199
E.1. Preparación y esterilización del material	199
E.2. Preparación de medios de cultivo	199
E.3. Técnica para la cuenta de microorganismos. Método de extensión superficial	203
E.4. Tinción de Gram	204

<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>Pág</b>
Tabla 1. Comparación de características fundamentales de las pruebas de biodegradabilidad aerobia rápida	36
Tabla 2. Biodegradación aerobia de algunos compuestos orgánicos	37
Tabla 3. Tabla comparativa entre las pruebas de biodegradabilidad aerobia rápida OECD 301-A e ISO 7827: 1994 (E)	39
Tabla 4. Características promedio del efluente crudo del ensilado y prensado del cempasúchil	50
Tabla 5. Valores promedio de los parámetros fisicoquímicos evaluados a diferentes tiempos obtenidos de la aplicación de la prueba de biodegradabilidad aerobia rápida	66
Tabla 6. Valores de consumo de oxígeno promedio acumulado medido como DBO (mg/L) y tasa de consumo de oxígeno por día (TCO) obtenidos de la aplicación de la prueba de biodegradabilidad aerobia rápida	69
Tabla 7. Cuenta total en placa y de grupos bacterianos tróficamente activos, después de 24 y 48 horas de incubación de muestras procedentes de la aplicación de la prueba de biodegradabilidad aerobia rápida	74
Tabla 8. Características macroscópicas y microscópicas de las colonias desarrolladas en los diferentes medio de cultivo utilizados durante la prueba de biodegradabilidad aerobia rápida	77
Tabla 9. Composición de las soluciones preparadas para el estudio de biodegradabilidad	80
Tabla 10. Características fisicoquímicas y microbiológicas del inóculo microbiano empleado	81
Tabla 11. Porcentaje de remoción de carbono orgánico disuelto (COD) en el agua residual sometida a la prueba OECD 301-A no modificada	90
Tabla 12. Porcentaje de remoción de carbono orgánico disuelto en los controles empleados durante la prueba OECD 301-A no modificada	90
Tabla 13. Valores promedio de los parámetros fisicoquímicos evaluados a	92

	<b>Pág</b>
diferentes tiempos de muestreo obtenidos de la aplicación de la prueba OECD 301-A no modificada	
Tabla 14. Cuenta total en placa y de grupos bacterianos tróficamente activos, después de 24 y 48 horas de incubación, de muestras procedentes de la aplicación de la prueba OECD 301-A no modificada	99
Tabla 15. Características morfológicas macroscópicas y microscópicas de las colonias bacterianas presentes en muestras provenientes de la prueba OECD 301-A no modificada	102
Tabla 16. Resultados de las pruebas bioquímicas empleadas para la identificación de las colonias Gram negativas presentes en muestras provenientes de la prueba OECD 301-A no modificada	102
Tabla 17. Porcentaje de remoción de carbono orgánico disuelto (COD) en el agua residual sometida a la prueba OECD 301-A modificada	103
Tabla 18. Porcentaje de remoción de carbono orgánico disuelto (COD) alcanzado a los 28 días de etapa experimental, en los controles empleados durante la prueba OECD 301-A modificada	104
Tabla 19. Valores promedio de los parámetros fisicoquímicos evaluados a diferentes tiempos de muestreo obtenidos de la aplicación der la prueba OECD 301-A modificada	105
Tabla 20. Relación de valores de consumo de oxígeno promedio acumulado y tasa de consumo de oxígeno (TCO) de muestras sometidas a la prueba OECD 301-A modificada	110
Tabla 21. Cuenta total en placa y de grupos bacterianos tróficamente activos, después de 24 y 48 horas de incubación, de muestras procedentes de la aplicación de la prueba OECD 301-A modificada	114
Tabla 22. Características morfológicas macroscópicas y microscópicas de las colonias bacterianas presentes en muestras provenientes de la prueba OECD 301-A modificada	117

	<b>Pág</b>
Tabla 23. Resultados de las pruebas bioquímicas empleadas para la identificación de las colonias Gram negativas presentes en muestras provenientes de la prueba OECD 301-A modificada	118
Tabla 24. Etapa experimental previa. Consumo de oxígeno (mg/L) durante la prueba de biodegradabilidad aerobia rápida	180
Tabla 25. Relación de matraces empleados y consumo de oxígeno (mg/L) de las muestras sometidas a la prueba OECD 301-A modificada	183
Tabla 26. Valores de carbono orgánico disuelto (COD) de las muestras sometidas a la prueba OECD 301-A modificada	185
Tabla 27. Valores de carbono orgánico disuelto (COD) de las muestras sometidas a la prueba OECD 301-A no modificada	186

### **ÍNDICE DE FIGURAS**

Figura 1. Curva de crecimiento microbiano	13
Figura 2. Perfiles de los valores de tasa de consumo de oxígeno (TCO) durante los 42 días de duración de la prueba de biodegradabilidad aerobia rápida	67
Figura 3. Consumo de oxígeno promedio durante la aplicación de la prueba de biodegradabilidad aerobia rápida	70
Figura 4. Perfil de comportamiento de los diferentes tipos de sólidos monitoreados durante la aplicación de la prueba de biodegradabilidad aerobia rápida	71
Figura 5. Cuenta total en placa y de grupos bacterianos tróficamente activos, después de 48 horas de incubación, para muestras provenientes de los diferentes matraces empleados durante la prueba de biodegradabilidad aerobia rápida	73
Figura 6. Diagrama general del montaje de la prueba OECD 301-A	87
Figura 7. Perfil de comportamiento de los sólidos totales y suspendidos presentes en las muestras sometidas a la prueba OECD 301-A no modificada	95
Figura 8. Perfiles de la cuenta total y de grupos bacterianos tróficamente activos después de 48 horas de incubación, para muestras sometidas a la	100

	<b>Pág</b>
Tabla 23. Resultados de las pruebas bioquímicas empleadas para la identificación de las colonias Gram negativas presentes en muestras provenientes de la prueba OECD 301-A modificada	118
Tabla 24. Etapa experimental previa. Consumo de oxígeno (mg/L) durante la prueba de biodegradabilidad aerobia rápida	180
Tabla 25. Relación de matraces empleados y consumo de oxígeno (mg/L) de las muestras sometidas a la prueba OECD 301-A modificada	183
Tabla 26. Valores de carbono orgánico disuelto (COD) de las muestras sometidas a la prueba OECD 301-A modificada	185
Tabla 27. Valores de carbono orgánico disuelto (COD) de las muestras sometidas a la prueba OECD 301-A no modificada	186

### ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Curva de crecimiento microbiano	13
Figura 2. Perfiles de los valores de tasa de consumo de oxígeno (TCO) durante los 42 días de duración de la prueba de biodegradabilidad aerobia rápida	67
Figura 3. Consumo de oxígeno promedio durante la aplicación de la prueba de biodegradabilidad aerobia rápida	70
Figura 4. Perfil de comportamiento de los diferentes tipos de sólidos monitoreados durante la aplicación de la prueba de biodegradabilidad aerobia rápida	71
Figura 5. Cuenta total en placa y de grupos bacterianos tróficamente activos, después de 48 horas de incubación, para muestras provenientes de los diferentes matraces empleados durante la prueba de biodegradabilidad aerobia rápida	73
Figura 6. Diagrama general del montaje de la prueba OECD 301-A	87
Figura 7. Perfil de comportamiento de los sólidos totales y suspendidos presentes en las muestras sometidas a la prueba OECD 301-A no modificada	95
Figura 8. Perfiles de la cuenta total y de grupos bacterianos tróficamente activos después de 48 horas de incubación, para muestras sometidas a la	100

	<b>Pág</b>
prueba OECD 301-A no modificada	
Figura 9. Porcentajes relativos de los grupos tróficos bacterianos después de 48 horas de incubación, procedentes de muestras sometidas a la prueba OECD 301-A no modificada	101
Figura 10. Representación esquemática del comportamiento del pH con respecto al sistema amortiguador bicarbonato/ácido carbónico durante la aplicación de la prueba OECD 301-A modificada	108
Figura 11. Perfil de los valores de tasa de consumo de oxígeno promedio (TCO) por día de las muestras sometidas a la prueba OECD 301-A modificada	111
Figura 12. Perfil de comportamiento de los sólidos totales y suspendidos presentes en las muestras sometidas a la prueba OECD 301-A modificada	112
Figura 13. Perfiles de la cuenta total y de grupos bacterianos tróficamente activos después de 48 horas de incubación, para muestras sometidas a la prueba OECD 301-A modificada	115
Figura 14. Porcentajes relativos de los grupos tróficos bacterianos después de 48 horas de incubación, procedentes de muestras sometidas a la prueba OECD 301-A modificada	116
Figura 15. Análisis comparativo de la concentración de oxígeno disuelto en las muestras sometidas a la prueba OECD 301-A no modificada (NOMOD) y modificada (MOD)	119
Figura 16. Perfil de los valores de pH para muestras sometidas a la prueba OECD 301-A no modificada (NOMOD) y modificada (MOD)	120
Figura 17. Comparación de los porcentajes de remoción de carbono orgánico disuelto para muestras sometidas a la prueba OECD 301-A no modificada (NOMOD) y modificada (MOD)	121
Figura 18. Porcentaje relativo de los diferentes grupos bacterianos tróficamente activos en las muestras sometidas a la prueba OECD 301-A no modificada (NOMOD)	125



	Pág
Figura 19. Porcentaje relativo de los diferentes grupos bacterianos tróficamente activos en las muestras sometidas a la prueba OECD 301-modificada (MOD)	126
Figura 20. Bacterias mesófilas aerobias desarrolladas en agar nutritivo	130
Figura 21. Bacterias proteolíticas desarrolladas en agar leche descremada	131
Figura 22. Bacterias sacarolíticas desarrolladas en un medio mínimo con sacarosa	131
Figura 23. Bacterias amilolíticas desarrolladas en agar almidón	132
Figura 24. Bacterias celulolíticas desarrolladas en agar celulosa	132
Figura 25. Tinción de Gram mostrando <i>Bacillus</i> spp. Bacilos esporulados Gram positivos (100x)	133
Figura 26. Tinción de Gram mostrando <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> . Cocobacilos Gram negativos (100x)	133
Figura 27. Resultados de la prueba de reducción de nitratos para la diferenciación de variedades de <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	134
Figura 28. Esquema de los componentes básicos del respirómetro VOITH-Sapromat B-12	172
Figura 29. Esquema de la pantalla de control	174
Figura 30. Esquema del matraz generador de oxígeno y del indicador de presión	177
Figura 31. Etapa experimental previa. Perfil de comportamiento de los diferentes matraces empleados durante la aplicación de la prueba de biodegradabilidad aerobia rápida	182
Figura 32. Perfil de comportamiento de los diferentes matraces empleados durante la prueba OECD 301-A modificada	184
Figura 33. Curva de calibración para la determinación de ortofosfatos	198

## RESUMEN

En México, no existe un procedimiento reconocido oficialmente que permita evaluar la biodegradabilidad de compuestos o productos. Por tal motivo, se planteó como objetivo de este trabajo; estudiar y aplicar una metodología de biodegradabilidad para compuestos orgánicos solubles en agua, por lo que la atención se enfocó de manera particular en la prueba denominada de biodegradabilidad aerobia rápida, para lo cual se tomó como referencia el procedimiento establecido en la norma internacional OECD 301-A "DOC Die Away-Test".

Para la aplicación de la metodología se realizó el montaje simultáneo de la prueba de biodegradabilidad aerobia rápida, de acuerdo con el procedimiento señalado en la OECD 301-A (utilizando una incubadora con agitación) y, paralelamente de manera modificada, utilizando el respirómetro automático VOITH-Sapromat B-12. Esto último con objeto de evaluar la conveniencia de la utilización de este tipo de equipos y la confiabilidad de los resultados obtenidos; todo ello, tomando como punto de referencia el fundamento teórico de las pruebas de biodegradabilidad. Cabe señalar que el respirómetro automático presenta como ventajas frente al procedimiento tradicional: el aporte continuo de oxígeno acorde con el requerimiento de cada muestra, agitación continua para el adecuado intercambio de gases y un baño de agua con temperatura controlada.

Por otra parte, a efecto de comprender de mejor manera este tipo de pruebas; se evaluaron algunos parámetros fisicoquímicos y microbiológicos, que se consideraron importantes para la interpretación de los resultados que se obtengan durante el desarrollo de la prueba. Los parámetros fisicoquímicos registrados fueron: pH, oxígeno disuelto, sólidos totales y suspendidos, nitrógeno total y ortofosfatos. En cuanto a los parámetros microbiológicos, se optó por cuantificar las bacterias de manera total y por grupos bacterianos tróficamente activos. Posteriormente, se realizó la identificación de las bacterias predominantes que se encontraron presentes en los medios de cultivo empleados en la cuantificación. A efecto de realizar la

intercalibración de los dos procedimientos, se decidió emplear el efluente pretratado anaerobiamente de aguas residuales provenientes del ensilado y prensado del cempasúchil. Esta selección del agua residual se hizo debido a que cuenta con la característica de estar altamente contaminada con materia orgánica disuelta, además de que ya se contaba con estudios previos sobre la misma.

De acuerdo con los resultados obtenidos, la aplicación de la prueba usando el procedimiento establecido en la OECD 301-A, arrojó un 68.2% de remoción de materia orgánica medida como carbono orgánico disuelto en 28 días; mientras que con la prueba modificada, usando el respirómetro automático, se logró un 89.5% en ese mismo lapso. De esta manera y bajo los criterios establecidos por la OECD 301-A, la muestra que permaneció en la incubadora no puede ser considerada como rápidamente biodegradable, en contraste con la evaluada en el respirómetro, la cual sí puede ser considerada como tal; ya que alcanzó por lo menos un 70% de remoción de materia orgánica en 28 días.

En cuanto a los resultados obtenidos del monitoreo de los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos adicionales, estos mostraron diferencias significativas entre ambos procedimientos, siendo aparentemente el suministro continuo de oxígeno acorde al requerimiento de la muestra, el responsable de dichas diferencias. Cabe señalar, que esta última característica proporcionada por el respirómetro, se considera adecuada para la realización de la prueba de biodegradabilidad aerobia rápida, ya que supera el inconveniente que representa el déficit de oxígeno o la necesidad en el aumento de las diluciones de la muestra original, lo cual puede ocasionar modificaciones drásticas de la muestra por analizar.

En consecuencia, se concluye que: la aplicación de la misma prueba de biodegradabilidad empleando distintos procedimientos puede originar diagnósticos diferentes. Por un lado, el uso de un respirómetro, como el empleado en este estudio permite superar la condición limitante que representa el suministro de oxígeno; el cual es indispensable para que se lleve a cabo la valoración de biodegradabilidad aerobia; sin embargo, dicho equipo presenta como principales

desventajas el costo para su adquisición y la limitante de sólo contar con 12 matraces de reacción; lo que en ocasiones no permite incluir varios matraces control o diversas concentraciones de la sustancia de prueba por duplicado. Por otra parte, la aplicación del procedimiento sin modificación, presenta la limitante de tener que preparar diluciones muy altas en muestras fuertemente concentradas y la insuficiente concentración de oxígeno disuelto, factores que pueden conducir a resultados erróneos.

# **CAPÍTULO PRIMERO**

## **INTRODUCCIÓN**

En la actualidad, el mundo industrializado se enfrenta a grandes problemas de la más diversa índole; sin embargo, en los últimos años la contaminación ambiental se ha convertido en un tema de preocupación y polémica generalizada en cuanto a sus causas, impacto social y consecuencias a mediano y largo plazo. El aire, el agua y el suelo presentan detrimento en su calidad, cuya recuperación se torna difícil no sólo por el tipo de contaminantes que contienen sino por las concentraciones en las que éstos se encuentran (Luna-Pabello *et al.*, 1994).

Todos los desechos industriales afectan de alguna manera la vida normal de un ecosistema. El avance tecnológico, industrial y agropecuario ha sido uno de los causantes de la aparición de nuevos agentes contaminantes. Un gran número de ellos, particularmente aquellos estructuralmente relacionados con compuestos naturales, son fácilmente degradados por microorganismos del suelo y agua. Sin embargo; existen los llamados xenobióticos, que se definen como compuestos que tienen elementos estructurales nuevos o sustituyentes raramente encontrados en la naturaleza, que son catabolizados lentamente y tienden a persistir y acumularse en el ambiente (Albert *et al.*, 1995).

De manera particular, la contaminación de los recursos hídricos ha despertado gran interés, debido a que el agua es indispensable para las diversas actividades humanas e industriales. Cuando las poblaciones humanas eran pequeñas y no existían grandes zonas industriales, las corrientes y lagos eran capaces de asimilar los desechos, porque los cuerpos de agua como ecosistemas tienen la propiedad de autopurificarse. Sin embargo, esta capacidad de asimilación es limitada, ya que al alcanzarse concentraciones relativamente altas aparece el fenómeno de contaminación, ello debido a que fue rebasada la tasa de depuración (Muñiz, 1987).

La contaminación del agua puede dividirse en tres tipos de acuerdo con los factores que la ocasionan:

- Físicos: Los sólidos suspendidos y la turbiedad impiden la penetración de la luz en el agua afectada, lo que ocasiona alteraciones en los procesos fotosintéticos y por consiguiente, en

las cadenas alimenticias, mientras que los agentes tensoactivos retrasan la autopurificación y el aumento en la temperatura disminuye la cantidad de oxígeno disuelto.

- Químicos: Provocan cambios que afectan las comunidades acuáticas. Por ejemplo, la salinidad hace que aumente la presión osmótica; muchas sustancias son más tóxicas al aumentar el valor del pH.
- Biológicos: El incremento en las concentraciones de nutrimentos, ocasiona que el balance de las poblaciones microbianas sea alterado y aumente el consumo de oxígeno, ocasionando tarde o temprano el agotamiento del oxígeno disuelto.

La degradación y remoción de residuos industriales, es hoy en día, un campo de estudio prioritario a nivel mundial (Trejo y Quintero, 1997). Para la solución de estos retos, han sido desarrolladas diversas tecnologías encaminadas a la eliminación de los contaminantes (Bouwer, 1992). 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 (por ejemplo, aguas y suelos contaminados orgánicamente).

La biodegradación de contaminantes orgánicos es facilitada por enzimas, durante las funciones metabólicas normales de los microorganismos, por medio de la asimilación del carbono orgánico presente en el sustrato y su conversión a productos inorgánicos. Durante esta transformación, hay liberación de energía que permitirá elevar la capacidad biosintética y la incorporación de carbono como constituyente celular, observándose un incremento en número y biomasa de la población. Las ventajas de la biodegradación incluyen la mineralización parcial o total del contaminante y el hecho de que las reacciones enzimáticas mediadas por microorganismos son generalmente más rápidas que las realizadas en ausencia de éstos. Sin embargo; el éxito de este 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 (Alexander, 1981). Las principales dificultades técnicas para este tipo de procesos son:

- La limitación en las velocidades de degradación, que dependen de la naturaleza del contaminante
- Su solubilidad en fase acuosa y su biodisponibilidad (Gutiérrez-Rojas, 1997)
- La efectividad de los microorganismos involucrados
- El carácter recalcitrante del compuesto, determinado por sus propiedades fisicoquímicas; como ejemplo pueden citarse los enlaces carbono-cloro de compuestos halogenados, la baja solubilidad en agua de compuestos poliaromáticos, el carácter lipófilo de los compuestos organoclorados, que coadyuva a su bioacumulación y los enlaces fósforo-éster en el caso de las sustancias organofosforadas

De acuerdo al artículo 140 de la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente vigente, “La generación, manejo y disposición final de los residuos de lenta degradación deberá sujetarse a lo que se establezca en las Normas Oficiales Mexicanas que al respecto expida la Secretaría del Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca (SEMARNAP) en coordinación con la Secretaría de Comercio y Fomento Industrial (SECOFI)”.

A este respecto, vale la pena abundar sobre el término de degradación. Cabe señalar que existen dos tipos de degradación; la degradación por métodos no biológicos o fisicoquímicos (por ejemplo, la fotocatalisis o la oxidación) y la degradación por métodos biológicos o biodegradación, que es llevada a cabo por microorganismos. A lo largo de este trabajo se hace hincapié en el proceso de biodegradación.



Sin embargo, hasta la fecha no existe un método estandarizado o normalizado para evaluar la biodegradabilidad de sustancias o compuestos. Por tal motivo, este trabajo busca estudiar y aplicar una metodología accesible para realizar la evaluación de la biodegradabilidad aerobia rápida de sustancias orgánicas, tomando como referencia los procedimientos ya establecidos en otros países.

Considerando que la biodegradación aerobia de compuestos orgánicos es un fenómeno natural y que las pruebas de biodegradabilidad aerobia rápida, pretenden cuantificar la remoción del contaminante llevada a cabo por los procesos metabólicos microbianos; es pertinente hacer referencia, en primer término, a generalidades e importancia de los principales ciclos biogeoquímicos, responsables de la asimilación y desasimilación de sustancias en la naturaleza.

## **CAPÍTULO SEGUNDO**

### **ANTECEDENTES**

## 2.1. MARCO TEÓRICO DE REFERENCIA

### 2.1.1. Importancia de los ciclos biogeoquímicos

Se define como ciclo biogeoquímico al proceso natural por el cual una sustancia se moviliza en la biosfera. Puede incluir el transporte a través de varios medios (aire, agua o suelo) seguido por una transformación ambiental y su acarreo a través de uno o más ecosistemas. También son conocidos como ciclos biológicos (Albert *et al.*, 1995). Existen muchos ciclos biogeoquímicos, sin embargo los más importantes para el reciclaje de elementos esenciales para la vida y contaminantes son el ciclo del carbono, del nitrógeno y del fósforo. La fácil y completa degradación de sustancias orgánicas a dióxido de carbono, agua, fosfatos y nitrógeno (de amoníaco) es uno de los principales requerimientos para mantener el equilibrio biológico en la naturaleza (Pitter, 1976).

El ciclo del carbono es el resultado de las actividades metabólicas de todos los miembros del ecosistema. Casi todos los compuestos orgánicos contienen carbono y casi todo el carbono inorgánico utilizado en la síntesis de compuestos orgánicos proviene del dióxido de carbono presente en la atmósfera, aunque se encuentran pequeñas cantidades disueltas en el agua. El carbono asimilado por los microorganismos es incorporado como biomasa de la comunidad microbiana involucrada en la descomposición de la materia orgánica o sale del sistema en forma de dióxido de carbono (Boyd, 1984).

El nitrógeno es requerido por todos los seres vivos para la síntesis de proteínas, ácidos nucleicos y otras moléculas que contienen nitrógeno. Los factores físicos, así como las reacciones químicas y la actividad de microorganismos en agua y suelo, son indispensables en la conversión de nitrógeno a formas utilizables. La mayor parte del nitrógeno en un sistema acuático se encuentra en forma de moléculas orgánicas como aminoácidos, aunque existe una pequeña fracción disuelta en forma de nitratos, nitritos y amonio. En algunos sistemas acuáticos se ha demostrado que el nitrógeno es el nutrimento limitante y controla, por lo tanto, la productividad del sistema. En aquellos sistemas donde no lo es, son los microorganismos

encargados del reciclaje los que determinan la disponibilidad de nitrógeno en el sistema (Boyd, 1984; Tórtora *et al.*, 1992).

El fósforo es requerido por todas las células, especialmente para la síntesis de moléculas como el ATP y ácidos nucleicos. La mayor reserva de fósforo en la biosfera se encuentra en rocas y sedimentos, también existe en el ambiente acuático como moléculas orgánicas y en formas inorgánicas insolubles como el fosfato. Al igual que el nitrógeno, el fósforo puede ser un nutriente limitante, por lo que el ciclo del fósforo es importante para mantener el equilibrio del ecosistema; siendo la comunidad microbiana que lleva a cabo el reciclaje la que hace que se encuentre disponible para otros organismos (Boyd, 1984; Tórtora *et al.*, 1992).

Cuando existe un desequilibrio en el desarrollo de los ciclos biogeoquímicos en la naturaleza se puede considerar la presencia de contaminación. Un gran número de microorganismos en el agua generalmente indica un elevado nivel de nutrientes. El agua contaminada por la descarga de residuos y por contaminantes orgánicos industriales biodegradables presenta una abundancia microbiana relativamente elevada. Sin embargo, una alta concentración de materia orgánica lleva a un elevado consumo de oxígeno, producto de la actividad metabólica de la población microbiana. Lo anterior redundará finalmente en agotamiento del oxígeno disuelto y muerte de organismos superiores como peces. Otro ejemplo lo representan los fosfatos provenientes de los detergentes. Los fosfatos no sufren cambios apreciables después de la mayoría de los tratamientos de aguas residuales y su presencia conduce a la eutroficación (sobreabundancia de nutrientes) originando el crecimiento desmesurado de algas y cianobacterias que ocasionan la muerte eventual de organismos superiores (Tórtora *et al.*, 1992).

La biodegradación de contaminantes en el ambiente se lleva a cabo a través de las diferentes etapas de los ciclos biogeoquímicos. Mediante la acción de las comunidades microbianas participantes es posible la conversión de sustancias complejas a otras más simples con aumento en la biomasa de la población involucrada en el metabolismo de los contaminantes. Esta conversión ocurre gracias a la disponibilidad de enzimas capaces de actuar sobre un sustrato en

particular. Las sustancias más simples obtenidas sirven para retroalimentar otra etapa del ciclo, lo que permite finalmente la asimilación del contaminante. Cuando se registra disminución en la actividad microbiana, puede existir disminución en la cantidad de elementos esenciales disponibles y muerte de los miembros del ecosistema.

Considerando que los microorganismos son responsables de los procesos de biodegradación, a continuación se abundará en algunos aspectos de importancia para la comprensión de la dinámica de crecimiento microbiano.

### 2.1.2. Generalidades sobre crecimiento microbiano

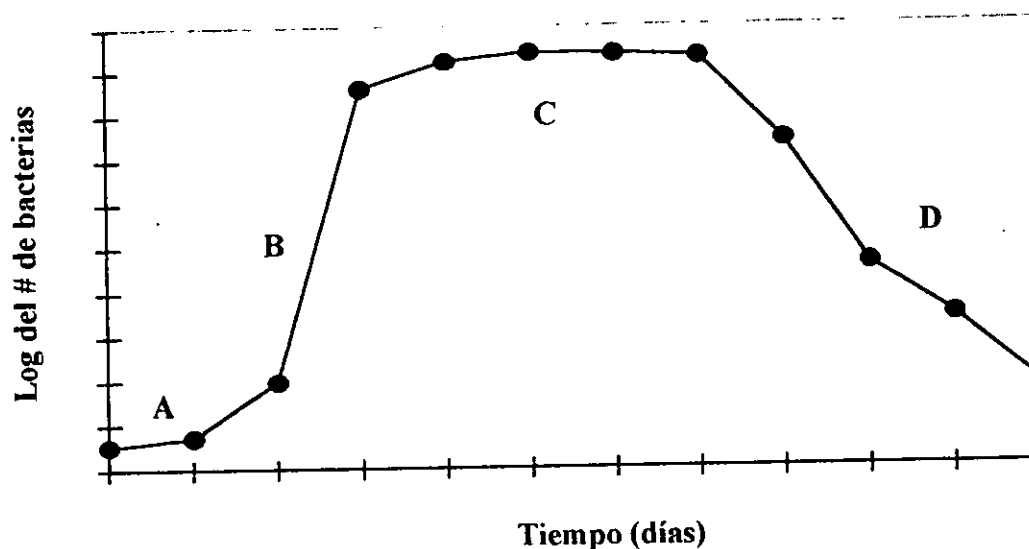
El crecimiento de bacterias en cultivo puede cuantificarse mediante el incremento de materia celular o el aumento del número de células (Freeman, 1989):

Incremento materia celular		Aumento número de células	
<b>Métodos directos</b>	<b>Métodos indirectos</b>	<b>Métodos directos</b>	<b>Métodos indirectos</b>
Peso seco	Determinación de algún componente celular relativamente constante como nitrógeno proteico, ácidos nucleicos o enzimas específicas	Cuenta con ayuda del microscopio	Medidas de turbidez, convertidas en número de células mediante el uso de una curva de calibración preestablecida
Volumen de masa celular previo a centrifugación			Dilución cuantitativa y cultivo en placa

Comúnmente, al inocular en medio de cultivo fresco un determinado número de bacterias, se puede apreciar que existe un período inicial en el cual no se registra crecimiento (fase lag), seguido por una etapa de rápido crecimiento (fase log o exponencial), que da lugar a una fase de relativo equilibrio (fase estacionaria) y, finalmente, la disminución de la población viable (fase de muerte). Entre cada una de estas fases existe un período de transición. Este representa el tiempo requerido antes de que todas las células entren en una nueva fase y significa que notodas las células poseen condiciones fisiológicas iguales al finalizar una etapa de crecimiento. En consecuencia, se requiere tiempo para que esta condición se alcance (Heritage *et al.*, 1996).

### 2.1.2.1. Curva de crecimiento microbiano (Freeman, 1989 ; Pelczar *et al.*, 1991; Romero, 1993; Heritage *et al.*, 1996)

A continuación, en la figura 1 se representa una curva de crecimiento microbiano típica. En los párrafos posteriores, se profundiza sobre cada una de las fases que componen dicha curva.



A: Fase latente (lag)  
C: Fase estacionaria

B: Fase de crecimiento exponencial (log)  
D: Fase de muerte

Figura 1. Curva de crecimiento microbiano

- **Fase latente (lag):** Cuando se inoculan bacterias a un medio fresco, se requiere cierto tiempo o período latente, para la adaptación al nuevo entorno que difiere del cultivo progenitor. Este período puede dividirse en una fase latente aparente y una real. La primera es consecuencia de la presencia de un cultivo de células inviables, en el sentido de que no van a reproducirse, aunque pueden continuar realizando sus funciones metabólicas y disminuyendo, por lo tanto, el tamaño del inóculo efectivo. La duración de la fase latente está, dentro de ciertos límites, directamente relacionada con el tamaño de un inóculo efectivo, por lo que pueden hacerse predicciones de su comportamiento durante la fase de

crecimiento exponencial. La verdadera fase de retraso es el periodo necesario para que las células viables del inóculo se adapten al medio ambiente que les rodea y sintetizen enzimas, coenzimas e intermediarios esenciales a concentraciones óptimas para el funcionamiento de la maquinaria celular; también se observan cambios fenotípicos sustanciales, ya que se registra aumento en el tamaño de las células. Cuando el inóculo se ha tomado de un cultivo en fase logarítmica, se elimina en gran medida o totalmente el periodo latente, debido a que las células se encuentran ya en estado de equilibrio fisiológico, lo que permite la máxima síntesis de protoplasma.

La fase latente puede prolongarse indefinidamente por interferencias con los procesos de adaptación. La aireación vigorosa inhibe el crecimiento y la multiplicación porque impide la acumulación de pequeñas cantidades de dióxido de carbono procedentes de la respiración endógena que son esenciales para el crecimiento. Análogamente, la adición de sustancias antibacterianas cuya acción es bacteriostática, pero no bactericida, provoca una duración indefinida de la fase latente.

Al finalizar la fase latente cada organismo se divide. Sin embargo, como no todos completan el periodo simultáneamente, hay un incremento gradual en la población hasta que éste finaliza, cuando todas las células son capaces de dividirse a intervalos regulares (Pelczar *et al.*, 1991).

- **Fase de crecimiento exponencial (logarítmica o log):** Es la etapa de desarrollo de un cultivo bacteriano durante la cual las células se replican a una proporción geométrica constante. Se considera que la población es casi uniforme en términos de composición química de las células, actividad metabólica y otras características fisiológicas. Esta estabilidad es aproximada debido a que el medio es alterado continuamente por los microorganismos y limitada porque se mantiene sólo una parte de la vida del cultivo. Por ello se utilizan células en esta fase para estudios de metabolismo microbiano.

Los nutrientes se encuentran en exceso con respecto a la demanda de la población microbiana. Debido a que el número de células se incrementa rápidamente, los nutrientes se agotarán y se registrará acumulación de sustancias tóxicas.

La tasa de crecimiento está obviamente determinada por factores limitantes. Estos pueden ser intrínsecos al potencial fisiológico de la célula, por ejemplo, la capacidad de transporte de nutrientes a través de la membrana celular y extrínsecos como factores ambientales entre los que se encuentran la concentración de un nutriente esencial, la cantidad de oxígeno oxidable o el grado de difusión del oxígeno dentro del cultivo.

- **Fase estacionaria:** Durante ella, se alcanza el máximo total de crecimiento. El final de la fase de crecimiento exponencial está marcado por un descenso relativamente rápido de la tasa de división celular, lo que señala el comienzo de la fase estacionaria. En dicha fase no se detiene por completo la división, pero las células empiezan a morir y las divisiones ocasionales contrarrestan estas muertes, de forma que el número de microorganismos permanece relativamente constante durante un tiempo. Durante esta fase se producen metabolitos secundarios que incluyen pigmentos, exotoxinas y antibióticos, así como esporas en respuesta a condiciones ambientales adversas.

El descenso de la tasa de división celular puede deberse a múltiples factores: disminución de nutrientes esenciales, disminución del sustrato oxidable para la producción de energía o difusión deficiente del oxígeno cuando la densidad celular es elevada. Por otra parte, puede producirse una acumulación de productos metabólicos tóxicos o inhibidores, tales como ácidos orgánicos que pueden ser tóxicos e inhibir el crecimiento microbiano o favorecer el desarrollo de otro tipo de microorganismos en el caso de contar con una población microbiana mixta.

- **Fase de muerte:** Después de la fase estacionaria, las bacterias pueden morir con mayor rapidez, aunque algunas células aún se reproduzcan. Durante la fase de muerte, el número de células viables disminuye exponencialmente, a la inversa de lo sucedido en la fase latente. Las



enzimas autolíticas se activan y la turbidez del cultivo disminuye progresivamente. La duración de esta etapa es variable dependiendo del tipo de microorganismos presentes en el medio de cultivo.

### **2.1.3. Factores abióticos que afectan el crecimiento microbiano**

El crecimiento y desarrollo de comunidades microbianas es influido por factores externos que pueden determinar su incremento, disminución o incluso muerte. Al mismo tiempo, existen condiciones óptimas para el desarrollo microbiano, por lo que a continuación se realizará una breve revisión de algunos de los principales factores abióticos que afectan el crecimiento microbiano. Cabe señalar que en función de su amplia o estrecha tolerancia a cambios ambientales, los microorganismos pueden ser catalogados como euritolerantes (amplia tolerancia) o estenotolerantes (estrecha tolerancia), pudiéndose incluso puntualizar un determinado parámetro, por ejemplo euritermo (amplia tolerancia a cambios de temperatura).

#### **2.1.3.1. Temperatura**

Todos los microorganismos poseen un intervalo de temperatura característico que permite su desarrollo. Existen tres temperaturas cardinales para describir el crecimiento microbiano (Heritage *et al.*, 1996):

- Temperatura mínima de crecimiento.
- Temperatura máxima de crecimiento.
- Temperatura óptima de crecimiento. Es la temperatura a la cual el microorganismo logra su desarrollo óptimo y en muchas ocasiones es muy similar a la temperatura existente en el medio del que fue aislado el microorganismo.

De acuerdo a las definiciones anteriormente citadas, los microorganismos se clasifican en:

- **Psicrófilos:** Crecen bien por debajo de los 15°C y su temperatura máxima de crecimiento es alrededor de los 20°C.
- **Mesófilos:** Pueden crecer dentro del intervalo de 15°C a 45°C; sin embargo, su temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre 20°C y 45°C.
- **Termófilos:** Pueden crecer a temperatura superiores a 45°C; no obstante, su temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre 55°C y 65°C. Algunos termófilos muy especializados pueden vivir a temperaturas superiores a los 100°C.

Las temperaturas bajas son por lo general bacteriostáticas, por lo tanto el metabolismo bacteriano disminuye considerablemente mientras que temperaturas muy altas producen desnaturalización de macromoléculas dando como efecto la coagulación de las proteínas; alteración de interacciones entre los pares de bases de los ácidos nucleicos, desaparición de asociaciones normales de los lípidos y proteínas de la membrana celular e inactivación de enzimas; provocando muerte celular (Freeman, 1989), aunque también existe la activación de algunas enzimas cuando la temperatura se incrementa (Lehninger *et al.*, 1993).

#### 2.1.3.2. Oxígeno

De acuerdo a la presencia de oxígeno, los microorganismos se pueden clasificar en (Tórtora *et al.*, 1992; Heritage *et al.*, 1996):

- **Aerobios estrictos:** Dependen de la presencia de oxígeno molecular (O<sub>2</sub>) disuelto.
- **Anaerobios estrictos:** Mueren en presencia de oxígeno atmosférico. Sin embargo, el oxígeno está presente en forma de sulfatos (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>), carbonatos (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>), y compuestos orgánicos.

- **Anaerobios facultativos:** Pueden crecer tanto aerobia como anaerobiamente, sin embargo su crecimiento es promovido por la presencia de oxígeno. Cuando éste no está disponible continúan su crecimiento a través de respiración anaerobia o fermentación.
- **Anaerobios aerotolerantes u oxígeno-tolerantes:** No pueden utilizar el oxígeno molecular para su crecimiento, pero lo toleran adecuadamente debido a que cuentan con la enzima superóxido dismutasa. La mayoría de ellos fermentan carbohidratos a ácido láctico.
- **Anóxicos:** Utilizan oxígeno que está químicamente unido a nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) y nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ), por lo que el nitrógeno en estado de oxidación 5+ o 3+ pasa a estado de oxidación cero o  $\text{N}_2$  (Eckenfelder y Grau, 1992).
- **Microaerobios:** Requieren una atmósfera con poca cantidad de oxígeno (2-10%). Su tolerancia limitada se debe quizás a sensibilidad a radicales superóxido y peróxido libres producidos a concentraciones letales bajo condiciones aerobias (Heritage *et al.*, 1996).

El  $\text{O}_2$  juega un doble papel en el desarrollo microbiano; puede actuar como aceptor de electrones en la cadena respiratoria o como nutrimento. Cuando el cultivo se encuentra bajo condiciones anóxicas o anaerobias, el  $\text{O}_2$  funciona como nutrimento. Las condiciones anaerobias se caracterizan por un potencial redox que excluye cualquier proceso oxidativo. Bajo condiciones anóxicas, se observa la hidrólisis del sustrato a menor velocidad que bajo condiciones aerobias (Eckenfelder y Grau, 1992).

### 2.1.3.3. pH

El pH se refiere a la acidez o alcalinidad de una solución. De acuerdo a este parámetro se establece la siguiente clasificación (Tórtora *et al.*, 1992):

- **Acidófilos:** Muestran marcada tolerancia por medios ácidos. Los hongos y las levaduras tienen un pH óptimo de 5.0 a 6.0.
- **Neutrófilos:** Presentan preferencia por medios con pH cercano a la neutralidad entre 6.5 y 7.5. La mayoría de las bacterias pertenece a este intervalo.
- **Alcalófilos:** Muestran tolerancia y/o afinidad por medios con pH superior a 7.5.

Debido a que las enzimas tienen un pH óptimo o un intervalo de pH en el que su actividad es máxima; a valores superiores o inferiores de pH la actividad enzimática disminuye (Lehninger *et al.*, 1993), afectando el crecimiento microbiano. Algunas bacterias contribuyen al mantenimiento de un pH óptimo en el medio de cultivo gracias a productos de su metabolismo como son los aminoácidos. Para la neutralización de condiciones ácidas dentro de los medios de cultivo, se incluyen las soluciones amortiguadoras elaboradas con sales de fosfato y peptonas (Tórtora *et al.*, 1992).

#### 2.1.3.4. Presión osmótica

La presión osmótica se refiere a la presión necesaria en la solución para impedir la tendencia del solvente a desplazarse a regiones de mayor concentración de soluto. Los microorganismos son hipertónicos con respecto al medio de cultivo del cual requieren de un 80% a 90% de agua para su crecimiento; sin embargo, la adición de soluto al medio de cultivo hace que aumente la presión osmótica y se vuelva un medio hipertónico. Las altas presiones osmóticas causan salida de agua a través de la membrana citoplásmica causando plasmólisis e inhibición del crecimiento bacteriano. Si la presión osmótica es muy baja se trata de un medio hipotónico, en el cual existe la tendencia de que el agua del medio entre en la célula y ésta sea lisada. Las bacterias Gram positivas son más resistentes a este factor que las Gram negativas. Se conoce como osmotolerantes a aquellos microorganismos que soportan altas presiones osmóticas. La adición

de cloruro de sodio ocasiona aumento de la presión osmótica. De acuerdo a este parámetro surge la siguiente clasificación (Tórtora *et al.*, 1992):

- **Halófilos extremos:** Soportan altas concentraciones de sal, algunas cercanas al 30%.
- **Halófilos facultativos:** No requieren altas concentraciones de sal, pero son capaces de crecer en medios con aproximadamente 2% de sal, lo que inhibe a la mayoría de las bacterias.

Existen microorganismos capaces de producir osmoprotectores como aminoácidos, glicerol, glucosa y otros para adaptarse a las condiciones de tonicidad del medio.

#### 2.1.3.5. Elementos traza y factores de crecimiento orgánicos

Los elementos traza necesarios para el metabolismo de las bacterias y que generalmente se encuentran en el agua o en alguno de los componentes del medio son: azufre, fósforo, magnesio, calcio, manganeso, zinc, cobre, cobalto, selenio y molibdeno. Estos elementos son esenciales para la actividad de ciertas enzimas, funcionando como cofactores (Tórtora *et al.*, 1992). Otros elementos pueden ser requeridos en forma particular por alguna especie o cepa bacteriana, en cuyo caso es necesario recurrir a literatura especializada sobre el tema o efectuar ensayos de crecimiento.

En cuanto a los factores de crecimiento, éstos son compuestos orgánicos esenciales que los organismos son incapaces de sintetizar, por lo que deben ser obtenidos directamente del medio. Entre los factores de crecimiento se encuentran las vitaminas, muchas de las cuales funcionan como coenzimas. En general, las bacterias pueden sintetizar sus propias vitaminas, sin embargo algunas carecen de enzimas indispensables para la síntesis de dichas vitaminas, por lo que se consideran como factores de crecimiento. Otros factores de crecimiento necesarios para las bacterias son los aminoácidos, purinas y pirimidinas (Tórtora *et al.*, 1992).

### 2.1.3.6. Presencia de sustancias tóxicas

Existen diferentes sustancias que en bajas concentraciones pueden inhibir el crecimiento microbiano, entre las más importantes es posible citar (Freeman, 1989):

- **Arsénico:** El arsenato (pentavalente) es un desacoplante de la fosforilación oxidativa mitocondrial. Se cree que el mecanismo se relaciona con la sustitución competitiva del fosfato inorgánico por arsenato en la formación de trifosfato de adenosina, con la consiguiente formación de un éster de arsenato inestable que se hidroliza con rapidez. Los compuestos arsenicales trivalentes inhiben muchas enzimas mediante la reacción con ligandos biológicos que contienen grupos -SH disponibles (Klaassen, 1991b).
- **Cianuro:** Tiene gran afinidad por el hierro en estado férrico. Reacciona con facilidad con el hierro trivalente de la citocromooxidasa en las mitocondrias, de modo que inhibe la transferencia electrónica durante la respiración celular (Klaassen, 1991b; Lehninger *et al.*, 1993).
- **Metales pesados:** Entre ellos se encuentra el plomo, el cadmio y el mercurio, los cuales pueden reaccionar con ligandos que contienen O-, S- y N- esenciales para las funciones fisiológicas normales. El complejo metálico resultante está formado por una unión coordinada, en la cual ambos electrones son aportados por el ligando, resultando en una lesión reversible. El mercurio por ejemplo, forma con facilidad uniones covalentes con azufre (Klaassen, 1991a). También causan inactivación de enzimas por precipitación de proteínas, ocasionando lesiones celulares irreversibles.
- **Fenoles:** Causan la ruptura de la membrana celular e inactivación de enzimas por desnaturalización y precipitación de proteínas.

- **Alcoholes:** Atacan la pared y membrana celular por solubilización de lípidos y desnaturalización de proteínas.
- **Detergentes catiónicos:** Tienen un fuerte efecto tensoactivo. Causan la ruptura de la membrana celular por interacción de carga con los fosfolípidos e inactivación de enzimas por desnaturalización de proteínas.
- **Detergentes aniónicos:** Afectan la permeabilidad de la membrana celular por combinación con la parte proteica de ésta.

#### 2.1.3.7. Potencial de oxidorreducción

Es un factor que influye en forma determinante en el desarrollo de las bacterias, en algunas de ellas favorece el metabolismo mientras que para otras resulta inhibitorio. En el ambiente el potencial de oxidorreducción ( $E\lambda$ ) es de aproximadamente + 0.2 a 0.4 V a un pH de 7.0, las bacterias aerobias crecen hasta con un mínimo de -0.2 V, mientras que las anaerobias requieren un intervalo menor de -0.2 V.

Una vez descritas las generalidades sobre ciclos biogeoquímicos, crecimiento microbiano y factores abióticos que lo afectan, lo que será de utilidad para el planteamiento del problema y posterior desarrollo experimental de este trabajo; se procederá al abordaje del fenómeno de biodegradación.

## 2.2 ASPECTOS GENERALES SOBRE BIODEGRADACIÓN

### 2.2.1. Concepto de biodegradación y términos relacionados

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. En consecuencia, la biodegradabilidad sería la capacidad de una sustancia para transformarse en

compuestos más sencillos por acción de los microorganismos. Dicha biotransformación implica un proceso mediante el cual el organismo modifica un compuesto que ha absorbido previamente, para dar posteriormente productos que puedan ser excretados o reabsorbidos (Albert *et al*; 1995).

Los procesos de biodegradación pueden ser agrupados en dos categorías: biodegradación primaria y biodegradación última (OECD, 1992a). La biodegradación primaria implica pequeñas alteraciones en la estructura química del compuesto, debida a la acción de los microorganismos, resultando en la pérdida de propiedades específicas de la sustancia. Por otra parte, se aplica el término de biodegradación última cuando el compuesto orgánico es totalmente utilizado por los microorganismos, dando como resultado dióxido de carbono, agua, sales minerales y biomasa. De acuerdo al tipo de atmósfera existente es posible distinguir dos procesos de biodegradación (Tórtora *et al*; 1992):

- **Biodegradación aerobia:** Es la degradación biológica que se lleva a cabo en ambientes con suficiente aireación, en los cuales se busca mantener una concentración de oxígeno molecular libre disuelto de al menos 2 mg/L. Los principales productos de la biodegradación de materia orgánica son dióxido de carbono, agua (debido a la reducción de oxígeno molecular) y biomasa microbiana.
- **Biodegradación anaerobia:** Este tipo de biodegradación es llevada a cabo por microorganismos que no requieren oxígeno molecular libre en solución, por lo que la concentración de oxígeno es muy baja o inexistente. Los microorganismos emplean compuestos inorgánicos aceptores de electrones como nitratos, nitritos y sulfatos, entre otros. Se promueve el crecimiento de bacterias anaerobias, especialmente metanógenas (que degradan la materia orgánica soluble originando metano y dióxido de carbono). Desde el punto de vista metabólico, este proceso es considerado como 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 sólo tipo de contaminante orgánico. Por consiguiente, la biodegradación de compuestos orgánicos puede ser lenta debido a que uno o más nutrientes inorgánicos indispensables para el crecimiento microbiano se encuentra solamente en bajas concentraciones ambientales. Si dos o más compuestos son rápidamente biodegradables, la concentración de oxígeno, fósforo y/o nitrógeno puede disminuir; adicionalmente la competencia por uno o varios de estos elementos también puede afectar la velocidad de biodegradación. La adición de nutrientes inorgánicos no siempre estimula la biodegradación, sobre todo si existen otros factores que pueden por sí mismos suprimir la actividad microbiana o interactuar con la limitación de nutrientes para disminuir la velocidad de biodegradación. Esta limitación puede exacerbarse debido a la presencia de grupos microbianos que utilizan los mismos elementos empleados para metabolizar otros compuestos orgánicos presentes que actúan como sustratos, lo cual conduce a la reducción en la velocidad de degradación del compuesto de prueba. La supresión de la biodegradación puede ser resultado de la inhibición por un segundo compuesto; su conversión a un producto tóxico, competencia por nutrientes orgánicos limitantes o bien, a la baja concentración de oxígeno molecular disuelto (Steffensen y Alexander, 1995).

Los factores que afectan la biodegradabilidad de las sustancias pueden ser divididos en tres grupos (Pitter, 1976):

- i. **Parámetros fisicoquímicos:** Temperatura, solubilidad, grado de dispersión del compuesto en el medio, pH y oxígeno disuelto.
- ii. **Características químicas:** Largo de la cadena, clase, número y posición de los sustituyentes en la molécula, estereoquímica y tonicidad del medio.
- iii. **Características biológicas:** Origen del cultivo microbiano, edad, tiempo y forma de adaptación, tolerancia a la toxicidad del compuesto de prueba y efecto de otros sustratos.

Una de las principales pruebas empleadas para conocer si una determinada muestra de agua contaminada contiene compuestos biodegradables, es la conocida como demanda bioquímica de oxígeno (DBO). Debido a su importancia para el entendimiento del presente trabajo, se hace necesaria su descripción.

### **2.2.2. Demanda bioquímica de oxígeno**

La prueba de demanda bioquímica de oxígeno (DBO) consiste en la medición del oxígeno, consumido en mg/L o ppm por las bacterias durante un período de incubación específico. Se presume que dicha concentración de oxígeno es empleada para la oxidación de la materia orgánica hasta dióxido de carbono y agua. Adicionalmente, también es posible medir el oxígeno utilizado para la oxidación de formas reducidas de nitrógeno a menos de que se impida por medio de la adición específica de un compuesto inhibidor químico.

La prueba de DBO tiene su más amplia aplicación en la determinación de contaminantes oxidables residuales presentes las instalaciones de tratamiento. También es importante para evaluar la capacidad de extracción o reducción de materia orgánica mediante sistemas de tratamiento y constituye una medida indirecta de la contaminación de aguas por materia orgánica biodegradable de origen natural. Debido a que este parámetro es influido por la cantidad de materia orgánica, la temperatura y el tiempo de incubación las condiciones de prueba son establecidas claramente en los métodos normalizados existentes para su cuantificación (APHA, 1992; Albert *et al.*, 1995). Al respecto, convencionalmente se ha fijado que la muestra en evaluación se mantenga a una temperatura de 20°C, durante 5 días y en ausencia de luz, a cuyo término debe medirse el oxígeno disuelto remanente.

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. En este sentido, se considera que un mg de oxígeno disuelto consumido durante la prueba es igual a un mg de materia orgánica biodegradada (APHA, 1992).

Durante los 5 días de la prueba de demanda bioquímica de oxígeno ( $DBO_5$ ), las bacterias oxidan principalmente la materia orgánica soluble presente en el agua. Durante este corto período ocurre muy poca oxidación de la materia sólida (insoluble). El grado de oxidación de los compuestos nitrogenados durante el período de incubación de 5 días depende de la presencia de microorganismos capaces de realizar dicha oxidación al igual que de la existencia de compuestos nitrogenados en concentraciones significativas. Las bacterias nitrificantes utilizan inmediatamente los compuestos de nitrógeno reducidos disponibles, creando una demanda bioquímica de oxígeno extra, atribuible al proceso de nitrificación, lo que provoca la obtención de valores erróneos para determinar la demanda bioquímica de oxígeno debida a compuestos carbonosos (McKinney, 1962).

Existen muchas variantes en la prueba de DBO. Entre ellas se encuentran la medición de períodos de incubación más cortos y más largos, las pruebas para determinar las tasas de captación de oxígeno y las determinaciones continuas de captación de oxígeno mediante técnicas respirométricas. Pueden elegirse condiciones alternativas de siembra, disolución e incubación para simular las condiciones del agua receptora, proporcionando una valoración de los efectos ambientales de las aguas residuales (APHA, 1992).

Se ha considerado el requerimiento de nitrógeno como una interferencia positiva para la determinación de la demanda bioquímica de oxígeno, ya que frecuentemente existe inclusión de amoníaco en el agua de disolución. En la actualidad es posible eliminar dicha interferencia mediante la adición de un inhibidor químico (2-cloro-6-(tricloro metil) piridina). Otras interferencias que deben ser tenerse en cuenta son: alcalinidad o acidez excesiva, presencia cloro residual y la existencia de sustancias tóxicas como metales pesados, fenoles y cianuros (APHA, 1992).

Las muestras sobresaturadas procedentes de aguas frías o donde se produce la fotosíntesis pueden contener más de 9 mgOD/L a 20°C. Para evitar la pérdida de oxígeno durante la incubación, debe reducirse la saturación llevando la muestra a 20°C, calentando en frascos

parcialmente llenos mientras se agitan con fuerza o se airean con aire comprimido limpio (APHA, 1992).

### 2.2.3. Métodos de cuantificación de la demanda bioquímica de oxígeno

Existen tres métodos para cuantificar la demanda bioquímica de oxígeno:

- **Método de dilución:** Es el método más ampliamente utilizado para la cuantificación de la DBO. La concentración de DBO en la mayoría de las aguas residuales supera la concentración de oxígeno disuelto disponible en una muestra saturada. Por lo tanto, frecuentemente es necesario diluir la muestra antes de incubación para equilibrar de forma adecuada el requerimiento y suministro de oxígeno. El método consiste en agregar cantidades crecientes de la muestra en botellas especiales y rellenar estas botellas con agua de dilución. El agua de dilución contiene una cantidad conocida de oxígeno disuelto, así como nutrientes inorgánicos y una solución amortiguadora. Las botellas son completamente llenadas, liberadas de burbujas, selladas y permanecerán en incubación durante 5 días a 20°C en la oscuridad (para evitar la fotosíntesis). Al inicio y al final del periodo de prueba, se cuantifica el oxígeno disuelto remanente, empleando para ello el método Winkler con la modificación de azida (Método estándar para la determinación de oxígeno disuelto, APHA, 1992). Para determinar la DBO se calcula la cantidad de oxígeno disuelto consumido por el inóculo microbiano. Para ello se resta de la concentración de oxígeno medida al inicio de la prueba y la cantidad de oxígeno que queda al finalizar el periodo de 5 días (APHA, 1992; Hach *et al.*, 1995). Es importante señalar que en la Ciudad de México, a temperatura ambiente, 585 mmHg de presión y 2240 metros sobre el nivel del mar, la concentración de oxígeno disuelto en el agua es de aproximadamente 7 mg/L, lo cual debe de tenerse presente a efecto de calcular las diluciones que será necesario realizar para el montaje de la prueba.

- **Método manométrico:** Este se basa en la medición directa del oxígeno consumido por las bacterias para la oxidación de la materia orgánica. Al igual que con el método de dilución, con frecuencia es necesario diluir la muestra de agua residual antes de la incubación para equilibrar el requerimiento y disponibilidad de oxígeno a lo largo de la prueba. El procedimiento a seguir es similar al empleado con el método de dilución, la diferencia fundamental radica en la cuantificación del oxígeno remanente al finalizar el período de prueba. En este caso, mientras se consume el oxígeno disuelto en el agua, aumenta la capacidad de disolución del oxígeno presente en el espacio de aire de la botella, razón por la cual se registra una caída de presión dentro del sistema y un manómetro calibrado mide dicha caída de presión en cada botella. Se requiere correr paralelamente un blanco con inóculo para normalizar los valores obtenidos con las muestras de agua residual. Este método tiene como ventaja el proveer de una indicación continua de la cantidad de oxígeno demandado por la muestra, sin embargo el suministro de oxígeno no es constante y sólo se dispone del existente al inicio de la prueba (Hach *et al.*, 1995).
- **Método respirométrico:** Consiste en determinar el consumo de oxígeno, mediante la cuantificación de la cantidad de oxígeno producido electroquímicamente, requerido para mantener el volumen de gas constante dentro del matraz del respirómetro o compensar las variaciones en el volumen y/o presión (o la combinación de ambos) lo cual es registrado por el respirómetro. El dióxido de carbono, producto del metabolismo microbiano, es absorbido en hidróxido de potasio, cal sodada u otra sustancia similar. La cantidad de oxígeno consumida por la población microbiana, durante la biodegradación del compuesto, debe ser corregida con el consumo de un blanco de inóculo corrido paralelamente, y el resultado es expresado como mg de oxígeno requerido para oxidar la sustancia, mg de oxígeno requerido/mg de compuesto de prueba o bien, mg oxígeno requerido/L de compuesto de prueba (OECD, 1992a).

A continuación, dada la importancia que tienen las pruebas de biodegradabilidad para el presente trabajo, se abundará al respecto.

#### 2.2.4. Pruebas de biodegradabilidad

Las pruebas de biodegradabilidad tienen como objetivo simular, en un ambiente controlado de laboratorio, el proceso de biodegradación que ocurre en la naturaleza (Slater *et al.*, 1995). El método clásico para demostrar la biodegradabilidad de una sustancia consiste en incubar una solución o suspensión de la misma en un medio mineral con un inóculo bacteriano, bajo condiciones ambientales controladas, durante lapso determinado (usualmente 28 días). El curso de la biodegradación es monitoreado mediante técnicas analíticas que cuantifican (Grady, 1985):

- La desaparición del compuesto de prueba medido como carbono orgánico disuelto (COD)
- La actividad metabólica bacteriana medida como demanda bioquímica de oxígeno (DBO)
- La producción de dióxido de carbono

Las determinaciones son realizadas a intervalos frecuentes de tiempo para permitir la identificación del principio y fin de la biodegradación. La realización de análisis químicos específicos permite determinar la concentración de compuestos o metabolitos intermediarios formados durante el proceso (Slater *et al.*, 1995).

Todas las pruebas de biodegradabilidad se basan en técnicas de cultivo de enriquecimiento donde se favorece la multiplicación celular de un grupo microbiano con características metabólicas específicas. Este enriquecimiento celular se logra a través del control de factores como temperatura, pH, aireación y fuente de inóculo, entre otros. La población inicial está compuesta por variedades de microorganismos tolerantes a un ambiente en particular, a efecto de disponer de varias rutas metabólicas para la biodegradación del compuesto de interés.

Las pruebas de biodegradabilidad diseñadas para agua dulce utilizan un inóculo bacteriano normalmente derivado de lodos activados, aunque también puede derivarse de agua superficial y/o suelo.

La elección del método a seguir, implica la necesidad de conocer la solubilidad, presión de vapor y características de adsorción de la muestra. De igual manera, es deseable conocer la estructura química o fórmula de la sustancia ensayada, con objeto de contar con una base de cálculo para el porcentaje de biodegradación alcanzado a través del tiempo, lo cual evidentemente no es posible de realizar en muestras de aguas residuales debido a su misma naturaleza (multisustratos en concentraciones variadas).

#### **2.2.4.1. Procedimiento general**

Para llevar a cabo una prueba de biodegradabilidad aerobia rápida se requieren una serie de matraces cuyos componentes, características y funciones se indican en los siguientes párrafos (OECD, 1992a,b ; ISO 1994).

- 1. Matraz control de procedimiento:** Es importante señalar que el desarrollo de la prueba y la viabilidad del inóculo bacteriano son evaluados por medio del control positivo. Dicho control está constituido por una sustancia química de referencia cuya biodegradabilidad es conocida y un determinado volumen de inóculo microbiano. Las sustancias comúnmente utilizadas son benzoato de sodio, acetato de sodio o anilina. El control positivo debe alcanzar al menos un 50% de eliminación de carbono orgánico disuelto para que la prueba sea válida.
- 2. Matraz control de toxicidad:** Éste contiene la sustancia de prueba, la sustancia de referencia y el inóculo. El porcentaje de eliminación de carbono orgánico disuelto debe ser al menos igual a la obtenida en el control positivo. En caso de obtener porcentajes de biodegradación más bajos o nulos se concluye que la sustancia de prueba es tóxica para los

microorganismos o suprime su actividad. Si ello ocurre, se recomienda probar una menor concentración de la sustancia de prueba.

3. **Matraz control de degradación abiótica:** Para evaluar la posible degradación abiótica (fotodegradación, oxidación química, dilución, etcétera) de la sustancia de prueba, se incluye un matraz sin inóculo y esterilizado ya sea por filtración en membrana (0.45  $\mu\text{m}$ ) o por adición de una sustancia tóxica ( $\text{HgCl}_2$ ).
4. **Matraz control de adsorción:** Este control se emplea para evaluar si el compuesto de prueba es adsorbido, especialmente cuando se utiliza un inóculo de lodos activados; debe incluirse un matraz similar al matraz control de degradación abiótica, pero inoculado.
5. **Matraz blanco:** También es conocido como testigo; el matraz solamente contiene el medio mineral y el inóculo. Es necesario en la obtención de los valores de biodegradación, ya que las mediciones posteriores deberán ser normalizadas con él (OECD, 1992).
6. **Matraz con sustancia de prueba:** Este contiene una dilución de la sustancia de prueba con una concentración de 10 a 40 mg COD/L en el medio mineral y un volumen determinado de inóculo (equivalente al 10% del volumen total del matraz empleado). Se recomienda preparar y evaluar estos matraces por duplicado.

La aplicación de este tipo de pruebas presenta como desventaja la obtención de resultados difíciles de extrapolar a pruebas de campo, debido a que las condiciones de ensayo pueden no ser similares a las del ambiente del que proviene la muestra. Las principales causas que conducen a esta dificultad son:

- **Condiciones ambientales específicas,** esenciales para el inicio de la biotransformación de contaminantes en su medio natural.



- **Cometabolismo:** Existen sustancias que por ellas mismas no pueden servir como única fuente de carbono pero pueden ser degradadas por una comunidad microbiana compleja en presencia de otros sustratos.
- **Aclimatación del inóculo:** El microorganismo aislado en el medio elegido puede no ser el más activo en el medio nativo, por lo que se requieren inóculos representativos, como por ejemplo suelo biológicamente activo.
- **Desarrollo de métodos analíticos específicos** para el seguimiento de la biodegradación debido a metabolitos intermediarios o sustancias desconocidas presentes en la muestra una vez iniciado el proceso.

#### 2.2.5. Clasificación de pruebas de biodegradabilidad (Grady, 1985; OECD, 1992a)

En general, las pruebas de biodegradabilidad pueden clasificarse en tres grandes grupos:

- **Pruebas de biodegradabilidad aerobia rápida:** Su objetivo es evaluar la facilidad con que una sustancia puede ser mineralizada bajo condiciones experimentales estrictas. Para su montaje pueden ser empleados respirómetros y matraces con o sin agitación. Una sustancia es considerada como rápidamente biodegradable cuando alcanza ya sea un 70% de remoción de materia orgánica medida como carbono orgánico disuelto, o bien un 60% del correspondiente al valor de demanda teórica de oxígeno o producción de dióxido de carbono, en un lapso de 28 días de evaluación. El nivel de aceptación es menor, cuando se emplea un método respirométrico, ya que una proporción del carbono de la sustancia de prueba es incorporada como biomasa; por lo que el porcentaje de dióxido de carbono producido es menor que el porcentaje de carbono utilizado. En este tipo de ensayos la sustancia de prueba es la única fuente de carbono y energía disponible. Se utiliza un inóculo de baja concentración celular que no ha tenido contacto previo con la sustancia de prueba.

Las pruebas realizadas de esta manera, tienen oportunidad limitada de que ocurra la aclimatación del inóculo. Un resultado positivo en estas pruebas, permite suponer que la sustancia evaluada podrá ser biodegradada rápida y completamente en el ambiente. Sin embargo, deben considerarse los factores fisicoquímicos y microbiológicos del sitio (por ejemplo temperatura, pH y potencial redox), así como el flujo de la sustancia en estudio, ya que pueden generarse subproductos de la biodegradación más tóxicos o bien, depósitos de sustancias peligrosas dentro del ecosistema. En esta prueba, la obtención de bajo porcentaje de biodegradación no necesariamente significa que la sustancia evaluada no sea biodegradable, sino que las condiciones experimentales en las que se realizó no fueron las adecuadas para ello.

- **Pruebas de biodegradabilidad aerobia intrínseca:** Este tipo de ensayos permite la exposición prolongada de la sustancia de prueba con los microorganismos, por lo tanto hay una mayor posibilidad de que ocurra la adaptación del inóculo, así como una relación biomasa/sustancia de prueba más equilibrada y otras condiciones que promueven la biodegradación. Un resultado positivo indica que la sustancia no permanecerá indefinidamente en el ambiente, pero no puede suponerse que la cinética de biodegradación ocurra de la misma manera en el sitio contaminado, ya que no necesariamente fueron proporcionadas las condiciones favorables para el ensayo. Cuando existe evidencia de que la biodegradación no se llevó a cabo de la manera esperada, es conveniente considerar el posible efecto de los subproductos de la biodegradación, ya que pueden inducir la inhibición por producto.
- **Pruebas de simulación:** En este caso las pruebas practicadas proveen de información acerca de la cinética de biodegradación bajo condiciones ambientales específicas. Los resultados obtenidos sientan las bases para el cálculo de concentraciones dentro del ecosistema, por lo que es necesario validar el modelo empleado para la simulación del sitio en estudio. Además, debe conocerse la distribución de la sustancia en el ambiente así como

su toxicidad potencial. Las pruebas se dividen de acuerdo al lugar que simulan ser; tratamiento biológico aerobio, tratamiento biológico anaerobio, río, lago, estuario, etc.

Una vez visualizada la ubicación de las pruebas de biodegradabilidad aerobia rápida, dentro de la clasificación general de las pruebas de biodegradabilidad y dada su importancia para el desarrollo del presente trabajo, se ampliará la información sobre las mismas.

### **2.2.6. Pruebas de biodegradabilidad aerobia rápida**

El Grupo de Expertos de la OECD recomienda una serie de pruebas para evaluar la biodegradabilidad aerobia rápida de compuestos orgánicos. Los métodos clasificados como OECD 301 para aguas dulces y los métodos OECD 306 para aguas marinas fueron diseñados para sustancias solubles en agua, no volátiles, sin adsorción a superficies (vidrio) y que no ocasionen efectos inhibitorios sobre la población microbiana. Existen adaptaciones para sustancias que no cumplan con alguno de estos requisitos.

Como puede observarse en la tabla 1, las seis pruebas comparadas presentan características similares (Grady, 1985; OECD, 1992a) entre las que pueden citarse:

- La sustancia de prueba es la única fuente de carbono disponible para el desarrollo microbiano y se encuentra a baja concentración.
- El sustrato es expuesto a una biomasa microbiana relativamente baja en concentración.
- Son aplicables a una gran variedad de compuestos orgánicos.
- El seguimiento de la cinética de biodegradación no requiere métodos analíticos específicos, lo que permite obtener información de la biodegradabilidad máxima del compuesto, ya que cuantifican cualquier residuo, subproducto o intermediario presente en el medio de prueba.

- El tiempo de prueba está estandarizado a 28 días, con la finalidad de obtener resultados reproducibles.
- En caso de que a los 28 días la biodegradación haya comenzado pero no alcanzado una meseta, se recomienda continuar la prueba hasta 42 días.
- La estandarización del inóculo provee de un parámetro de comparación entre los diversos métodos; sin embargo, reduce significativamente el número de especies presentes en el sistema, por lo que es recomendable el uso de un inóculo mixto. El potencial genético de un inóculo mixto es mayor que el de un cultivo puro.
- Debido a lo riguroso del ensayo, no debe permitirse la preadaptación del inóculo bacteriano al compuesto de prueba, ya que ello implicaría la obtención de datos inadecuados para evaluar la biodegradabilidad aerobia rápida de éste.

Las diferencias fundamentales entre estas pruebas son (Grady, 1985; OECD, 1992):

- El origen del inóculo bacteriano (lodos activados, aguas residuales domésticas, aguas municipales, sobrenadante de suelo de jardín, efluente secundario, etcétera).
- La concentración del material de prueba y el método analítico requerido para seguir el curso de la cinética de biodegradación.
- Diferentes concentraciones de algunos elementos en el medio mineral.

Tabla 1. Comparación de características fundamentales de las pruebas de biodegradabilidad aerobia rápida (OECD, 1992a)

Prueba	Tipo de prueba	Método analítico	P	V	A	D	Concentración de la sustancia de prueba	Concentración del inóculo	Concentración de elementos en el medio mineral (mg/L)	pH	T (°C)
Disminución de COD (301A)	Matraz agitado	Carbono orgánico disuelto	-	-	*	*	10 a 40 mgCOD/L	< 30 mg SS/L ≤ 100 mL efluente/L 10 <sup>7</sup> a 10 <sup>8</sup> células/L	P: 116; N: 1.3; Na: 86; K: 122; Mg: 2.2; Ca: 9.9 y Fe: 0.05 a 0.1	7.4 ± 0.2	22 ± 2
Producción de CO <sub>2</sub> (301 B)	Respirométrica	Producción de dióxido de carbono	+	-	+	10 a 20 mgCOD/L	≤ 30 mg SS/L ≤ 100 mL efluente/L 10 <sup>7</sup> a 10 <sup>8</sup> células/L	P: 116; N: 1.3; Na: 86; K: 122; Mg: 2.2; Ca: 9.9 y Fe: 0.05 a 0.1	7.4 ± 0.2	22 ± 2	
MITI (I) (301 C)	Respirométrica	Consumo de oxígeno	+	*	+	100 mg/L	30 mg SS/L 10 <sup>7</sup> a 10 <sup>8</sup> células/L	P: 29; N: 1.3; Na: 17.2; K: 36.5; Mg: 6.6; Ca: 29.7 y Fe: 0.15	7	25 ± 1	
Botella cerrada (301 D)	Demanda bioquímica de oxígeno	Oxígeno disuelto	*	+	+	2 a 10 mg/L 5 a 10 mg DTO/L	≤ 5 mL efluente/L 10 <sup>4</sup> a 10 <sup>6</sup> células/L	P: 11.6; N: 0.13; Na: 8.6; K: 12.2; Mg: 2.2; Ca: 9.9 y Fe: 0.05 a 0.1	7.4 ± 0.2	22 ± 2	
Monitorio OECD modificada (301 E)	Matraz agitado	Carbono orgánico disuelto	-	-	*	10 a 40 mgCOD/L	≤ 0.5 mL efluente/L 10 <sup>5</sup> células/L	P: 116; N: 1.3; Na: 86; K: 122; Mg: 2.2; Ca: 9.9 y Fe: 0.05 a 0.1	7.4 ± 0.2	22 ± 2	
Respirométrica manométrica (301 F)	Respirométrica	Consumo de oxígeno	+	*	+	100 mg/L 50 a 100 mg DTO/L	≤ 30 mg SS/L ≤ 100 mL efluente/L 10 <sup>7</sup> a 10 <sup>8</sup> células/L	P: 116; N: 1.3; Na: 86; K: 122; Mg: 2.2; Ca: 9.9 y Fe: 0.05 a 0.1	7.4 ± 0.2	22 ± 2	

**Nota:** COD: Carbono orgánico disuelto, DTO: Demanda teórica de oxígeno, SS: Sólidos suspendidos, T: Temperatura, PS: Sustancias poco solubles, V: Sustancias volátiles, AD: Sustancias con adsorción a superficies. (+) Adecuada, (-) No adecuada, (\*) Medianamente adecuada. MITI: Ministerio de Comercio Internacional e Industria, Japón.

Una limitante del proceso de biodegradación aerobio involucra la recalcitrancia de ciertos compuestos los cuales son biodegradados apreciablemente sólo bajo condiciones anaerobias. En contraste las bacterias aerobias degradan con facilidad compuestos aromáticos; que en condiciones anaerobias se tornan recalcitrantes, ya que producen oxidasas para abrir el anillo aromático (Bouwer y Zehnder, 1993). En la tabla 2 se presenta una relación de diferentes compuestos orgánicos y la biodegradabilidad aerobia estimada para cada uno de ellos.

**Tabla 2. Biodegradación aerobia de algunos compuestos orgánicos (Eckenfelder y Grau, 1992)**

Rápidamente biodegradable <sup>a</sup>	Moderadamente biodegradable <sup>b</sup>	Ligeramente biodegradable <sup>c</sup>	Recalcitrante <sup>d</sup>
Ciclohexano	1- Decanol	Decano	Dodecano
Octano	1-Dodecanol	1,3-Dicloropropano	Diclorometano
Fenol	Acetona	Etil éter	Cloroformo
1-Propanol	Etilbenceno	Fenantreno	1-Cloropropano
1-Butanol	4-Bromofenol		1-Clorobutano
1-Hexanol	Hidroquinona		1-Clorodecano
Dietanol amina	Benzonitrilo		1,2-Dicloroetileno
Acetonitrilo			3-Cloro-1,2-propano
Benceno			Isopropil éter
Tolueno			Acido tricloroacético
Xileno			Clorobenceno
Naftaleno			1,3-Diclorobenceno
Alcohol bencílico			1,2,4- Triclorobenceno
m-Cresol			Tetracloruro de carbono
p-Cresol			Hexaclorobenceno
4-Clorofenol			

<sup>a</sup> DBO/DTO > 50%, <sup>b</sup> DBO/ DTO 25-50%, <sup>c</sup> DBO/ DTO 10-25%, <sup>d</sup> DBO/ DTO < 10%  
 DBO: Demanda bioquímica de oxígeno, DTO: Demanda teórica de oxígeno

Como se citó anteriormente, la biodegradación aerobia es un proceso oxidativo y el oxígeno molecular consumido por los microorganismos aerobios, durante el ensayo de biodegradabilidad, es definido como demanda bioquímica de oxígeno (DBO). La cantidad de oxígeno molecular teóricamente requerido para la completa oxidación del compuesto es la demanda teórica de oxígeno (DTO), la cual puede ser calculada a partir de la siguiente fórmula

química. A partir de la relación DBO/DTO, es posible predecir la biodegradabilidad de una determinada sustancia o compuesto, como puede apreciarse en la tabla 2.

$$\text{DTO} = \frac{16 [ 2c + 0.5 (h-cl-3n) - 0 ]}{\text{pm}}$$

donde: c = # de átomos de carbono  
h = # de átomos de hidrógeno  
o = # de átomos de oxígeno

n = # de átomos de nitrógeno  
cl = # de átomos de cloro  
pm = peso molecular

El carbono orgánico disuelto (medida de la cantidad de carbono oxidable de la materia presente) puede sustituir a la DTO cuando no se conoce la estructura química de la sustancia (Zitomer y Speece, 1993) o cuando se tiene una mezcla con multisustratos. La evaluación de biodegradabilidad dependiente de la disminución de carbono orgánico disuelto en el medio permite la evaluación de la cantidad total de sustrato orgánico removido durante un lapso determinado. El grado y velocidad de degradación puede ser cuantificado, expresado y comparado de manera confiable (Pitter, 1976).

A continuación, en la tabla 3 se presenta una relación comparativa de las pruebas de biodegradabilidad aerobia rápida OECD 301-A e ISO 7827: 1994 (E). A partir de las diferencias significativas existentes entre ellas, mismas que se destacan en negritas, se procedió a la selección de la que se consideró más adecuada. Cabe destacar que mediante el análisis practicado a dichas normas se pudieron proponer modificaciones y/o adecuaciones a las omisiones detectadas en los procedimientos revisados. La traducción íntegra de ambas pruebas de biodegradabilidad y los comentarios al respecto, se encuentran descritos dentro del Anexo A de este documento.

Como se puede inferir de la comparación de ambas pruebas, éstas resultan similares, siendo en ocasiones una más específica que la otra. No obstante, considerando que la denominada OECD 301-A incluye una descripción más completa y considera explícitamente aspectos de importancia fundamental para la correcta aplicación de la prueba de biodegradabilidad aerobia rápida, se optó por seleccionarla.

**Tabla 3. Tabla comparativa entre las pruebas de biodegradabilidad aerobia rápida OECD 301- A e ISO 7827: 1994 (E) (OECD 1992a,b; ISO, 1994)**

Parámetros y/o características	Prueba OECD 301-A		ISO 7827:1994 (E)	
	1992		1994	
Año de publicación				
Fundamento de la prueba	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Determinación del porcentaje de COD (carbono orgánico disuelto) removido al finalizar el período de prueba</li> <li>2. Posibilidad de realizar análisis específicos para determinar biodegradabilidad primaria</li> <li>3. No considera el uso de concentraciones mayores de la sustancia de prueba</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Determinación del porcentaje de COD (carbono orgánico disuelto) removido al finalizar el período de prueba</li> <li>2. Posibilidad de realizar análisis específicos para determinar biodegradabilidad primaria</li> <li>3. No considera el uso de concentraciones mayores de la sustancia de prueba</li> </ol>		
Características fisicoquímicas de la sustancia de prueba	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Concentración de la sustancia de prueba de 10 a 40 mgCOD/L</li> <li>2. Soluble a esa concentración de prueba</li> <li>3. Sin adsorción a superficies</li> <li>4. Que no ocasione efectos inhibitorios sobre la población microbiana</li> <li>5. No volátil</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Concentración de la sustancia de prueba de 10 a 40 mgCOD/L</li> <li>2. Soluble a esa concentración de prueba</li> <li>3. Sin adsorción a superficies o todos activados</li> <li>4. Que no ocasione efectos inhibitorios sobre la población microbiana</li> <li>5. No volátil</li> </ol>		
Condiciones de prueba	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Temperatura entre 22 y 25 °C</li> <li>2. Oscuridad o luz difusa</li> <li>3. No indica el tener una atmósfera libre de vapores tóxicos para los microorganismos</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Temperatura entre 20 y 25 °C</li> <li>2. Oscuridad o luz difusa</li> <li>3. <b>Atmósfera libre de vapores tóxicos para los microorganismos</b></li> </ol>		
Agua requerida	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Agua destilada o desionizada, que introduzca no más de 10% de COD (carbono orgánico disuelto) a la muestra</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Agua destilada o desionizada, que introduzca no más de 10% de COD (carbono orgánico disuelto) a la muestra</li> </ol>		



Continuación Tabla 3. Tabla comparativa entre las pruebas de biodegradabilidad aerobia rápida OECD 301-A e ISO 7827: 1994 (E) (OECD 1992a,b; ISO, 1994)

Parámetros y/o características	Prueba OECD 301-A	ISO 7827:1994 (E)
Frecuencia de muestreo y determinación de COD	<p>1. Se cuantifica COD a tiempo = 0 y 28 días. De acuerdo al desarrollo y resultados de la prueba, se incluyen tiempos de muestreo intermedios, pero no se sugiere cuáles podrían evaluarse</p>	<p>1. Se cuantifica COD a tiempo = 0 y 28 días. Además, se incluyen al menos 3 tiempos de muestreo intermedios (7, 14 y 21 días)</p>
Composición del medio mineral	<p>1. Indica volver a preparar soluciones en caso de observar un precipitado</p> <p>2. Indica la posibilidad de utilizar <math>\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}</math></p> <p>3. Composición de las soluciones patrón igual en ambas pruebas (consultar anexos A.1 y A.2)</p>	<p>1. No indica volver a preparar soluciones en caso de observar un precipitado</p> <p>2. No indica la posibilidad de utilizar <math>\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}</math></p> <p>3. Composición de las soluciones patrón igual en ambas pruebas (consultar anexos A.1 y A.2)</p>
Preparación del medio mineral	<p>1. Tomar 10 mL solución patrón [a] + 800 mL de agua + 1 mL de soluciones patrón [b], [c] y [d]. Aforar a 1 L con agua.</p>	<p>1. Tomar 10 mL solución [a] + 500 mL de agua + 1 mL de soluciones patrón [b], [c] y [d]. Aforar a 1 L con agua.</p>
Equipo y material utilizado	<p>1. Filtro con membranas convenientes</p> <p>2. Matraces Erlenmeyer de 250 mL a 2 L y material de vidrio de uso común en laboratorio</p> <p>3. Incubadora con agitación</p> <p>4. Analizador de COD</p> <p>5. Centrífuga</p>	<p>1. Filtro con membranas de <math>0.2\mu\text{m}</math> a <math>0.45\mu\text{m}</math> con mínima adsorción de compuestos orgánicos o liberación de COD</p> <p>2. Matraces Erlenmeyer de capacidad apropiada y material de vidrio de uso común en laboratorio</p> <p>3. Incubadora con agitación</p> <p>4. Analizador de COD</p> <p>5. Centrífuga</p>
Distribución de los matraces	<p>Solución de prueba (2), blanco del inóculo (2), controles de: adsorción, toxicidad, degradación abiótica y de procedimiento (este último contiene una sustancia de biodegradabilidad conocida)</p>	<p>Solución de prueba (2), blanco del inóculo (2), controles de: adsorción, toxicidad, degradación abiótica y de procedimiento, (este último contiene una sustancia de biodegradabilidad conocida)</p>

Continuación Tabla 3. Tabla comparativa entre las pruebas de biodegradabilidad aerobia rápida OECD 301-A e ISO 7827: 1994 (E) (OECD 1992a,b; ISO, 1994)

Parámetros y/o características	Prueba OECD 301-A	ISO 7827:1994 (E)
Preparación de solución de sustancia de prueba	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Cuando la solubilidad de la sustancia de prueba es mayor a 1 g/L disolver 1 a 10 g en agua y aforar a 1 L</li> <li>2. Preparar solución de sustancia prueba en medio mineral</li> <li>3. Añadir directamente al medio mineral y disolver completamente</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Preparar soluciones patrón en agua o medio mineral. Diluir una cantidad apropiada de esta solución en medio mineral para obtener una concentración final de 10 a 40 mgCOD/L</li> </ol>
Preparación del control de adsorción	Solución de sustancia de prueba en medio mineral con adición de inóculo y un agente esterilizante a las concentraciones apropiadas	Solución de sustancia de prueba en medio mineral, con adición de inóculo y un agente esterilizante a las concentraciones utilizadas con anterioridad
Preparación del control del inóculo	Medio mineral con adición de inóculo pero sin la solución de sustancia de prueba	Medio mineral con adición de inóculo pero sin la solución de sustancia de prueba
Preparación de la solución de sustancia de referencia	Se pueden utilizar: anilina, benzoato de sodio o acetato de sodio. Preparar soluciones patrón y añadir volúmenes suficientes para obtener una concentración entre 10 a 40 mgCOD/L en el medio de prueba	Se pueden utilizar anilina, benzoato de sodio, acetato de sodio. Preparar soluciones patrón en agua o medio mineral. Diluir una cantidad apropiada de esta solución en medio mineral para obtener una concentración final entre 10 a 40 mgCOD/L
Preparación del control de toxicidad	Agregar el inóculo y una solución conteniendo concentraciones similares de sustancia de prueba y de referencia al medio mineral	Preparar una solución conteniendo sustancia de prueba y de referencia a las concentraciones utilizadas anteriormente y añadir al medio mineral. Inocular
Preparación del control de degradación abiótica	Solución del medio mineral sin inóculo, esterilizada por filtración en membrana o adición de una sustancia tóxica a la concentración adecuada	Solución de medio de prueba sin inóculo, esterilizada con 1 mL/L de una solución conteniendo 10g/L de HgCl <sub>2</sub> u otra sustancia inorgánica para prevenir actividad microbiana

Continuación Tabla 3. Tabla comparativa entre las pruebas de biodegradabilidad aerobia rápida OECD 301-A e ISO 7827: 1994 (E) (OECD 1992a,b; ISO, 1994)

Parámetros y/o características	Prueba OECD 301-A	ISO 7827:1994 (E)
Volumen del inóculo	No indica el volumen, pero la concentración final de SS introducida al medio, no debe ser mayor de 30 mg/L	<p>Añadir 1 a 10 mL de inóculo por cada 1000 mL de solución de prueba. Indica características que debe cumplir:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Suficiente para tener una población con actividad adecuada</li> <li>2. Que degrade la sustancia de prueba en el porcentaje estipulado</li> <li>3. Con <math>10^3</math>-<math>10^6</math> células activas/mL</li> <li>4. Que el lodo activado no introduzca más de 30 mg/L de SS en la mezcla final</li> </ol>
Origen del inóculo	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Lodos activados</li> <li>2. Efluentes de agua residuales</li> <li>3. Aguas superficiales</li> <li>4. Suelo</li> <li>5. Mezcla de los anteriores</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Planta de lodos activados</li> <li>2. Efluentes secundarios</li> <li>3. Agua superficial</li> </ol>
Inóculo a partir de aguas superficiales	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Colectar una muestra del agua apropiada, por ejemplo río, lago, etcétera y mantenerla bajo condiciones aerobias hasta su uso. Si es necesario concentrar la muestra por filtración o centrifugación</li> <li>2. No indica el volumen se requerido para el inóculo</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Tomar una muestra apropiada, si es necesario, concentrarla por filtración o centrifugación. Mantenerla bajo condiciones aerobias y emplearla el mismo día de su recolección.</li> <li>2. No indica que volumen se requiere como inóculo</li> </ol>
Inóculo de efluente secundario	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Utilizar más de 100 mL de inóculo</li> <li>2. No indica la caducidad del mismo</li> <li>3. Preparación similar (ver anexos A.1 y A.2)</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. No indica el volumen a utilizar</li> <li>2. Usar el inóculo el mismo día de su preparación</li> <li>3. Preparación similar (ver anexos A.1 y A.2)</li> </ol>

Continuación Tabla 3. Tabla comparativa entre las pruebas de biodegradabilidad aerobia rápida OECD 301-A e ISO 7827: 1994 (E) (OECD 1992a,b; ISO, 1994)

Parámetros y/o características	Prueba OECD 301-A	ISO 7827:1994 (E)
Inóculo a partir de lodos activados	<p>1. Tomar la muestra de lodos activados a partir de un tanque de aireación de una planta de tratamiento o reactor a escala de laboratorio que trate preferentemente aguas domésticas). <b>Retirar las partículas gruesas por filtración a través de un tamiz fino y mantener en aireación hasta su uso</b></p> <p>2. Es posible centrifugar la muestra, descartar el sobrenadante y lavar el inóculo en medio mineral. Suspender el lodo concentrado en medio mineral para obtener una concentración de 3 a 5 gSS/L. Mantener en condiciones aerobias hasta su uso</p> <p>3. Si el inóculo se obtiene de una planta de tratamiento convencional, debe ser lavado previamente para evitar la presencia de sustancias potencialmente inhibitorias y/o tóxicas, descartar el sobrenadante y resuspender en medio mineral. Repetir el procedimiento las veces que se considere sea necesario.</p> <p>4. Resuspender el inóculo y tomar una muestra para la determinación de los sólidos suspendidos</p>	<p>1. Tomar muestra de lodos activados a partir de un tanque de aireación de una planta de tratamiento o reactor a escala de laboratorio que trate principalmente aguas domésticas. Mezclar bien y mantener en aireación. <b>Utilizar el inóculo el mismo día de su obtención</b></p> <p>2. Determinar la concentración de sólidos suspendidos. De ser necesario, concentrar el lodo por sedimentación para así introducir un volumen mínimo de inóculo al medio de prueba.</p> <p>3. <b>Añadir el volumen necesario de inóculo al medio mineral para obtener 30 mg/L de sólidos suspendidos en la mezcla final</b></p>

Continuación Tabla 3. Tabla comparativa entre las pruebas de biodegradabilidad aerobia rápida OECD 301-A e ISO 7827: 1994 (E) (OECD 1992a,b; ISO, 1994)

Parámetros y/o características	Prueba OECD 301-A	ISO 7827:1994 (E)
Procedimiento	<p>1. Tomar volúmenes de medio mineral y de soluciones patrón para obtener una concentración entre 10 a 40 mgCOD/L. <b>Verificar el valor de pH y de ser necesario ajustarlo a 7.4 unidades.</b> Inocular los matracas para obtener una concentración no mayor de 30 mgSS/L. Montar el experimento con los matracas indicados en "Distribución de matracas"</p> <p>2. Para compensar la pérdida de agua por evaporación, antes de tomar la muestra, comprobar el volumen y añadir agua hasta la cantidad observada durante el muestreo anterior. Obtener las muestras en los tiempos convenientes previamente</p> <p>3. Tomar un volumen mínimo de muestra para el análisis de COD. Mezclar los matracas antes de sacar la muestra para asegurar la resuspensión del material adherido a las paredes. Filtrar a través de filtro de membrana o centrifugar la muestra inmediatamente después de su obtención. Determinar las concentraciones de COD por duplicado y realizar los análisis específicos y/o adicionales correspondientes. Si se obtiene más de 80% de remoción de COD o se alcanza una meseta antes de 28 días, la prueba se da por terminada. Extender la prueba por 1 o 2 semanas más si a los 28 días continúa la degradación y no se ha alcanzado una meseta</p>	<p>1. Montar el experimento con los matracas indicados en "Distribución de matracas"</p> <p>2. Para compensar la pérdida de agua por evaporación, antes de tomar la muestra comprobar el volumen y añadir agua hasta la cantidad observada durante el muestreo anterior 3. Tomar muestras en los tiempos indicados de los matracas con solución de prueba, blancos del inóculo, control de procedimiento y control de toxicidad. <b>Retirar muestras del control abiótico a t=0 y 28 días y del control de adsorción a t= 0 y 1 día.</b></p> <p>4. Filtrar las muestras a través de filtro de membrana o centrifugar a 40,000m/s<sup>2</sup> durante 15 minutos, especialmente si el material se adsorbe a la membrana.</p> <p>5. Determinar las concentraciones de COD por duplicado y realizar los análisis específicos y/o adicionales correspondientes. Si se obtiene más de 80% de remoción de COD o se alcanza una meseta antes de 28 días, la prueba se da por terminada. Extender la prueba por 1 o 2 semanas más si a los 28 días continúa la degradación y no se ha alcanzado una meseta</p>

Continuación Tabla 3. Tabla comparativa entre las pruebas de biodegradabilidad aerobia rápida OECD 301-A e ISO 7827: 1994 (E) (OECD 1992a,b; ISO, 1994)

Parámetros y/o características	Prueba OECD 301-A	ISO 7827:1994 (E)
El reporte debe incluir:	<p>1. Datos de identificación de la sustancia de prueba, naturaleza física y de ser necesario propiedades fisicoquímicas</p> <p>2. Condiciones de prueba: Naturaleza y procedencia del inóculo, concentración, cualquier tratamiento de preacondicionamiento, <b>proporción y origen de aguas residuales industriales en las aguas residuales estudiadas</b>, si se conoce, duración de la prueba y temperatura, <b>en el caso de sustancias con baja solubilidad, métodos de preparación de las soluciones/suspensiones</b>, método para cuantificar COD, justificación y razones científicas de cualquier cambio en procedimiento</p> <p>3. Resultados: Datos en forma tabular, cualquier fenómeno de inhibición observado, degradación abiótica, datos químicos analíticos específicos, datos analíticos de productos intermediarios, la gráfica del porcentaje de degradación contra tiempo de la sustancia de prueba y de referencia, la fase lag y la pendiente, porcentaje de remoción al llegar a la meseta, al final de la prueba o después del período de 10 días</p>	<p>1. La referencia a la norma ISO. Toda la información necesaria para la identificación del compuesto de prueba</p> <p>2. Todos los datos obtenidos y la curva de degradación, la concentración de la sustancia de prueba utilizada y el contenido de COD a esta concentración</p> <p>3. El nombre de la sustancia de referencia utilizada y la degradación obtenida</p> <p>4. La fuente, características, concentración o volumen de inóculo utilizado, así como cualquier pretratamiento</p> <p>5. Principales características del método de análisis de COD, temperatura de incubación</p> <p>6. Porcentaje de degradación abiótica y porcentaje de degradación en el control de toxicidad y de toxicidad de la sustancia de prueba</p> <p>7. <b>Razones de rechazo, en caso de existir y cualquier modificación al procedimiento estándar o circunstancia que pudiera afectar los resultados obtenidos</b></p>

Continuación Tabla 3. Tabla comparativa entre las pruebas de biodegradabilidad aerobia rápida OECD 301-A e ISO 7827: 1994 (E)

Parámetros y/o características	Prueba OECD 301-A	ISO 7827:1994 (E)
Conservación de muestras	<p>Analizar las muestras filtradas o centrifugadas el mismo día de su obtención, de otra manera conservar a 2-4°C por un máximo de 48 horas o a -18°C para períodos más largos, para retrasar la actividad microbiana</p>	<p>Cuando la determinación de COD no puede realizarse durante las siguientes 48 horas, conservarlas a 4°C cerradas y en la oscuridad. Si el análisis demorará más de este tiempo debe guardarse a -18°C. Es posible agregar 20mL/L de una solución de 10g/L de HgCl<sub>2</sub> y guardar a 4°C, para evitar la actividad microbiana</p>
Criterios de validez	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. La variación de los duplicados en la determinación de COD debe ser menor al 20% al finalizar la prueba o al final del período de 10 días y el porcentaje de remoción de la sustancia de referencia medido como COD debe haber alcanzado por lo menos 70% a los 14 días</li> <li>2. Si en una prueba de toxicidad se obtiene menos del 35% de eliminación de COD en 14 días, se supone que la sustancia de prueba es inhibitoria</li> <li>3. El nivel de aceptación para biodegradabilidad rápida es de 70% de remoción de COD, este debe ser alcanzado, en un período máximo de 10 días dentro de los 28 días que dura la prueba</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. La variación en las determinaciones de COD en matraces con la misma concentración e inóculo no debe ser mayor al 20%</li> <li>2. La sustancia de referencia debe tener un porcentaje de remoción de COD mayor de 70% a los 14 días</li> </ol>

En el siguiente apartado, se proporcionará información general sobre el origen de las aguas residuales empleadas en este estudio

### **2.3. AGUAS AGROINDUSTRIALES. CASO DE ESTUDIO: AGUAS RESIDUALES DEL ENSILADO Y PENSADO DEL CEMPASÚCHIL PRETRATADAS ANAEROBIAMENTE**

Tomando en cuenta que los volúmenes de aguas residuales generados en nuestro país son considerables y que el laboratorio en dónde se realizó la presente tesis cuenta con una amplia experiencia en el área de tratamiento de aguas residuales de origen agroindustrial; así como con acervo bibliográfico e información experimental previa, se decidió realizar los ensayos experimentales con las aguas residuales del ensilado y pensado del cempasúchil pretratadas anaerobiamente.

#### **2.3.1. Generalidades sobre la flor de muerto o cempasúchil**

Existe en México una flor indígena, que desde el punto de vista taxonómico, es incluida dentro de la familia de las Compuestas, en la tribu Tageteae. Entre los géneros de esta tribu, destacan por su mayor diversidad y número de especies, los géneros *Dyssodia* y *Tagetes*.

El género *Tagetes* consta de 43 especies americanas, algunas introducidas en Asia y Australia. En América se distribuyen desde las latitudes 36 N a 36 S, comprendiendo desde el sur de Estados Unidos hasta el sur de Argentina. Pueden encontrarse en regiones montañosas, áridas y frecuentemente en hábitats mésicos que van de moderadamente elevados, hasta 4500 metros, siendo el centro y sur de México su área de mayor diversidad (Casarrubias *et al.*, 1996; Armendáriz, 1998).

De las 20 especies de *Tagetes*, la mexicana *Tagetes erecta*, es una planta herbácea, erecta y anual que alcanza de 50 a 60 cm de altura. Sus hojas son opuestas, divididas, dentadas y olorosas (aromáticas); con flores grandes (5 ó 6 cm de diámetro) de color anaranjado amarillento o rojizo y de olor penetrante. Esta flor, es conocida como flor de muerto o



cempasúchil (alteración de su antiguo nombre azteca Cempoalxóchitl, que literalmente significa veinte flores, pero como ese número era ponderativo entre los indígenas, puede traducirse como flor de muchos pétalos de cempoalli = veinte, en el sentido de muchos y xóchitl = flor). Los floricultores la siembran entre los meses de mayo y junio, para que florezcan alrededor de meses de octubre y noviembre. Se cultiva con fines ornamentales, ya que forman parte indispensable del culto de Día de Muertos en el mes de noviembre como una ofrenda en los sepulcros.

Desde hace poco más de 30 años, el cempasúchil ha adquirido importancia desde el punto de vista económico. Para su aprovechamiento industrial la flor es cosechada y deshidratada. Las harinas producidas son adquiridas directamente por la industria avícola, para ser usadas como aditivo de alimentos balanceados de gallinas ponedoras y pollos de engorda. También, a través de un segundo proceso, esta vez de extracción, se obtienen los pigmentos puros comprendidos dentro de las xantofilas, que se emplean como colorantes para la industria alimentaria, para cosméticos y en la industria químico-farmacéutica (Chávez-Sánchez *et al.*, 1995).

La flor es cultivada principalmente en 8 estados de la República y su producción total en 1993, contando riego y temporal fue de 13,388 toneladas. Los estados que la producen actualmente son, en orden decreciente: Oaxaca, Michoacán, Chiapas, Morelos, Distrito Federal, Jalisco, Guanajuato y Guerrero. Actualmente se ha detectado una baja en la producción, debido a los problemas que enfrenta el campo y las compañías dedicadas a la industrialización del cempasúchil, entre ellos se incluyen los derivados de la generación de aguas residuales altamente contaminadas. Los países a los que se exporta la harina son: Argentina, España, Estados Unidos, Francia, Holanda, Italia, Portugal y Alemania. Las exportaciones también han registrado una disminución considerable, lo que ha ocasionado un alto índice de desempleo en ese ramo industrial.

### 2.3.2. Aguas residuales provenientes del ensilado y prensado del cempasúchil

El proceso para la obtención de harinas, a partir del cempasúchil, comprende en primer término el ensilado de la flor (esto es, por medio de procesos anaerobios de descomposición, se libera parte del agua intracelular, a través de la ruptura de la pared celular) y, posteriormente se efectúa el prensado mecánico para la extracción de una porción adicional de agua. Como siguiente paso, la torta o masa obtenida es enviada a los equipos de secado que introducen corrientes de aire caliente por convección. La torta deshidratada es enviada a molinos para homogenizar el tamaño de partícula y composición. Finalmente, el producto es envasado para su venta o procesamiento (Chávez-Sánchez *et al.*, 1995). Por lo tanto, para la obtención de harina de flor, se presentan dos operaciones generadoras de aguas residuales, con elevados contenidos de material orgánico disuelto y en suspensión. Aproximadamente, se generan 1.4 L/s de aguas residuales derivadas del procesamiento de 200 toneladas flor/día (Anónimo, 1990). El proceso de ensilado aporta la mayor parte de la carga contaminante, contribuyendo a casi la totalidad de los parámetros, con excepción de los sólidos suspendidos y sedimentables, los cuales son aportados por el efluente de prensado.

El efluente global (ensilado+prensado) presenta un valor de pH de tipo ácido, con un elevado contenido de materia orgánica, reflejado por la alta concentración de sólidos suspendidos volátiles, demandas química y bioquímica de oxígeno, grasas y aceites. Asimismo, la concentración de nutrimentos es elevada y se reportan altas concentraciones de sólidos sedimentables (Tabla 4). A pesar de su naturaleza, eminentemente orgánica, los valores reportados de sólidos disueltos y conductividad eléctrica sugieren un contenido de material inorgánico y recalcitrante a la depuración biológica. Este tipo de agua residual tiene una relación DBO<sub>5</sub>/DQOs de 0.58, lo que significa que una porción de la materia orgánica medida como DQOs no es biodegradable o fácilmente biodegradable por vía aerobia (Durán-de-Bazúa, 1993; Casarrubias *et al.*, 1996). Además, la presencia de ácidos húmicos y fúlvicos (productos de la descomposición vegetal); interfieren de cierta manera en los procesos biológicos de tratamiento de efluentes, razón por la cual los desechos que contienen se pueden clasificar como medianamente biodegradables (Granados *et al.*, 1996).

**Tabla 4. Características promedio del efluente crudo del ensilado y prensado del cempasúchil (Anónimo, 1990)**

Parámetros	Concentración
Sólidos suspendidos totales (mg/L)	10025
Sólidos suspendidos volátiles (mg/L)	8400
Sólidos disueltos totales (mg/L)	32050
Sólidos sedimentables (ml/L)	200
N-amoniaco (mg/L)	290
N-orgánico (mg/L)	490
Fosfatos (mg/L)	1550
Demanda química de oxígeno total (mg/L)	85630
Demanda química de oxígeno soluble (mg/L)	50570
Demanda bioquímica de oxígeno total (mg/L)	51400
Demanda bioquímica de oxígeno soluble (mg/L)	29570
Grasas y aceites (mg/L)	480
pH (unidades)	4.4
Conductividad ( $\mu$ mho/cm)	12200
Coliformes totales (NMP/100mL)	0.0
Caudal (L/s)	1.4

Para analizar la factibilidad de tratar estas aguas por medio de métodos biológicos utilizando un tren de tratamiento anaerobio/aerobio se han realizado varios estudios previos. El tren de tratamiento está compuesto de un reactor de lecho de lodos de flujo ascendente (RALLFA) y un reactor biológico rotatorio (RBR) (Durán-de-Bazúa *et al.*, 1994; Chávez-Sánchez *et al.*, 1995; Casarrubias *et al.*, 1996; Granados *et al.*, 1996; Armendáriz, 1998). Se ha demostrado por medio de técnicas cromatográficas y espectroscópicas, que en el influente del reactor anaerobio existen compuestos alifáticos de cadena larga (carotenoides) así como compuestos aromáticos muy variados (2,4- diclorofenol, 4-clorofenol, 4,4-diclorobifenil, iso-octifalato, 4-metoxi, 5-hidroxi, 7-acetilflavona, 4-cloroetil, 1,3-bencenoditiol). En el efluente se observa que los compuestos aromáticos aún están presentes o sea, que no fueron biodegradados por las biocomunidades anaerobias. Complementariamente, los compuestos alifáticos están presentes en muy bajas concentraciones en el efluente anaerobio, lo que indica que estos si fueron convertidos por los microorganismos anaerobios a energía, biomasa y biogás (Granados *et al.*, 1996).

### 2.3.3. Consecuencias ambientales

La contaminación del ambiente por efecto de las descargas de aguas residuales, es un asunto que debe abordarse mediante acciones que permitan reducir o eliminar el desequilibrio en los sistemas naturales, incidiendo en el tratamiento de estas aguas residuales previo a su disposición en el medio.

Debido a las características de la materia orgánica disuelta biodegradable, que contienen las aguas de proceso del cempasúchil, para la producción de harinas, se han originado problemas de contaminación ambiental como son:

- Emisión de malos olores
- Creación de un ambiente propicio para la reproducción de moscas, mosquitos y otros insectos
- Aumento en la carga microbiana hacia los cuerpos receptores (agua y suelo), provocando en el caso de los ríos, que la autopurificación natural no pueda conservar condiciones aerobias
- Peligro de contaminación de acuíferos subterráneos por infiltración, lixiviación, etcétera

Lo anterior implica que, al ser arrojados dichos efluentes a corrientes y cuerpos receptores acuáticos, causen deterioros ambientales como:

- Presencia de compuestos químicos recalcitrantes o tóxicos
- Daño a la flora y fauna acuáticas (al existir déficit en la concentración de oxígeno disuelto)
- Inutilización del cuerpo de agua como fuente de abastecimiento para asentamientos humanos aledaños

Durante mucho tiempo se ha permitido que las industrias descarguen la mayoría de sus residuos a los cuerpos acuáticos naturales buscando que su eliminación sea por arrastre y dilución en el agua. Al incrementarse el número de industrias, el volumen de producción de aguas residuales,

y la disminución en el caudal de los ríos (debido a el uso intensivo de los recursos hídricos), el problema generado por los residuos industriales ha tomado características alarmantes. De aquí la importancia de buscar sistemas de tratamiento económicos, lo cual es una ventaja de los sistemas de tratamiento biológico con respecto a los de tipo fisicoquímico (Durán-de-Bazúa, 1993; Durán-de-Bazúa *et al.*, 1994; Luna-Pabello *et al.*, 1994). No obstante, el inconveniente que presentan estos sistemas es determinar si el agua residual a tratar es o no biodegradable y , en su caso, en qué proporción o porcentaje. Por tal motivo, es importante abundar en dicho aspecto.

#### 2.3.4. Biodegradabilidad de efluentes

Típicamente, la biodegradabilidad de un agua residual se estima por medio de la relación  $DBO_5/DQO$ . A partir del cálculo de este índice se puede inferir *a grosso modo* si la o las sustancias a depurar son fácilmente biodegradables o si presentan características que determinan su recalcitrancia y/o toxicidad para los microorganismos responsables de llevar a cabo el proceso de depuración (Durán-de-Bazúa, 1993; Casarrubias *et al.*, 1996). Con esta relación es posible tener una idea de la pertinencia o no de aplicar métodos de tratamiento de tipo biológico o fisicoquímico.

$DBO_5/DQO > 0.4$	Es biodegradable, se puede emplear un sistema biológico por organismos floculados o fijos en un lecho, tanto aerobios como anaerobios
$0.2 < DBO_5/DQO < 0.4$	Es medianamente biodegradable, se recomienda emplear lechos bacterianos tanto aerobios como anaerobios
$0 < DBO_5/DQO < 0.2$	Es muy poco o no biodegradable, no es adecuado y/o factible utilizar métodos biológicos para el tratamiento. Por lo tanto, es conveniente emplear métodos fisicoquímicos

Cabe señalar que no obstante que la relación  $DBO_5/DQO$  es importante en la selección del tipo de tratamiento a utilizar para un agua residual en particular, la concentración es otro factor que también influye en dicha selección. Por lo tanto, se recomienda que concentraciones de mayores a 1000 mg $DBO_5/L$ , sean tratadas por medio de sistemas anaerobios y concentraciones por debajo de este valor límite, sean tratadas en sistemas aerobios; pudiéndose proponer un tren de tratamiento cuando ello proceda (Eckenfelder y Grau, 1992).

## 2.4 JUSTIFICACIÓN

Actualmente, existe un creciente interés por conocer si una sustancia en particular puede ser considerada como biodegradable, debido al impacto negativo que ha tenido sobre el ambiente la disposición inadecuada de residuos. Sin embargo, en México, no existe un procedimiento oficialmente reconocido, que permita evaluar la biodegradabilidad de compuestos o productos. Por lo tanto, para el desarrollo de este trabajo, el cual constituye una primera aproximación de propuesta para un método que permita evaluar la biodegradabilidad aerobia rápida; fueron tomadas como referencia las normas internacionales de la OECD (Organization for Economical Cooperation and Development, Francia), ISO (Organization for International Standarization, Suiza) y EPA (Environmental Protection Agency, Estados Unidos). Después del análisis y comparación entre la OECD 301-A e ISO 7827:1994 (E), se seleccionó la OECD 301-A en función de su mejor fundamentación, la cual sirvió como base para la realización de la parte experimental de este trabajo y cuyo procedimiento se encuentra descrito con detalle en el Anexo A. En ese mismo anexo, se presentan comentarios sobre algunos aspectos de la norma que no son expuestos con amplitud suficiente.

En el siguiente capítulo, se desglosarán los objetivos planteados y la estrategia de trabajo elaborada para la consecución de los mismos.

## **CAPÍTULO TERCERO**

### **OBJETIVOS**

**Y**

### **ESTRATEGIA DE TRABAJO**

---

### 3.1. OBJETIVO GENERAL

Estudiar, seleccionar y aplicar un procedimiento estandarizado para la evaluación de la biodegradabilidad aerobia rápida de compuestos orgánicos, mediante el análisis, comparación y discusión previa de pruebas similares reconocidas a nivel internacional.

### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudiar y seleccionar una prueba de biodegradabilidad aerobia rápida y realizar el montaje de la metodología para su calibración
- Sugerir adecuaciones y/o modificaciones a los procedimientos consultados antes de la aplicación de la prueba de biodegradabilidad aerobia rápida
- Aplicar la prueba seleccionada de manera paralela empleando dos procedimientos: el método establecido en las pruebas consultadas (botellas Winkler) y de manera modificada utilizando un respirómetro automático
- Aplicar la prueba de biodegradabilidad aerobia rápida a las aguas residuales del ensilado y prensado del cempasúchil pretratadas anaerobiamente
- Evaluar los grupos bacterianos tróficamente activos durante el proceso de biodegradación estudiado e identificar aquellos que resulten de mayor interés
- Realizar el seguimiento fisicoquímico del proceso de biodegradación a lo largo del período de prueba



- Discutir acerca de la importancia de los factores fisicoquímicos y microbiológicos que influyen en la biodegradabilidad de una sustancia; con base en ello, sugerir adecuaciones y/o modificaciones a los procedimientos consultados

### 3.3. ESTRATEGIA DE TRABAJO

Para el desarrollo de este trabajo fue necesario, en primer término, hacer una revisión bibliográfica y analizar la información relacionada con pruebas de biodegradabilidad aerobia rápida; prestando énfasis en las catalogadas como "Ready biodegradability 301-A. DOC Die-away test" de la OECD e ISO 7827: 1994 (E). Water quality — Evaluation in an aqueous medium of the "ultimate" aerobic biodegradability of organic compounds — Method by analysis of dissolved organic carbon (DOC). En segundo término, una vez analizadas dichas pruebas de biodegradabilidad, se procedió a seleccionar en función de su mejor fundamentación, la denominada OECD 301-A. Como tercer paso se procederá para efectuar el montaje y calibración de la metodología. Es importante señalar que como parte importante de esta etapa se incorporarán las modificaciones y/o adecuaciones propuestas a las omisiones que presentan dichos procedimientos. Dichas modificaciones esta basadas en el conocimiento de factores fisicoquímicos, biológicos y humanos que pueden afectar el procedimiento y los resultados de la prueba.

Asimismo, se realizarán las adecuaciones pertinentes para la aplicación de la prueba de biodegradabilidad aerobia rápida empleando un respirómetro automático VOITH-Sapromat B-12, lo cual se describe en el Anexo B, ello a efecto de homologar ambos procedimientos. Lo anterior con objeto de superar, mediante el uso del respirómetro automático, las deficiencias intrínsecas de la prueba en su versión original (Anexos A y B). Es importante señalar, que antes de comenzar con los experimentos encaminados a la realización de este trabajo, el respirómetro automático había sido calibrado y verificado en cuanto a su funcionamiento; por lo que se puede asegurar, que el equipo se encontraba en condiciones óptimas para desarrollar este tipo

---

de pruebas. Los resultados de todo el trabajo de calibración previo no se incluyen dentro de este documento, ya que esa etapa no estuvo contemplada dentro de los objetivos de esta tesis.

Debido a la naturaleza de este tipo de pruebas analíticas, se hace necesario realizar pruebas de calibración para cada procedimiento y, posteriormente efectuar la intercalibración. Para este último punto y dado el carácter eminentemente aplicativo de la prueba de biodegradabilidad seleccionada, se planteó el uso de un agua residual agroindustrial, la cual debe contener materia orgánica en solución y estar libre de contaminantes tóxicos que puedan inhibir la actividad de los microorganismos involucrados en el proceso de biodegradación. El agua seleccionada para realizar el estudio fue el efluente de un reactor anaerobio que trataba aguas residuales provenientes del ensilado y prensado del cempasúchil, lo cual ya fue comentado anteriormente. Cabe señalar que se considera necesario realizar una etapa experimental previa a fin de conocer el funcionamiento y eficiencia del equipo, manejo de técnicas analíticas fisicoquímicas y microbiológicas, entre otras. Los resultados de dicha fase permitirán tener idea del proceso de biodegradación aerobia del agua residual, los grupos bacterianos tróficamente activos y el porcentaje de remoción de materia orgánica disuelta a través de todo el periodo experimental; así como prevenir errores en el manejo de la muestra.

Posteriormente, para el montaje e intercalibración de la prueba de biodegradabilidad aerobia rápida, se realizarán paralelamente las pruebas en una incubadora con agitación controlada y en un respirómetro automático VOITH-Sapromat B-12. Las muestras deben ser preparadas simultáneamente y bajo las mismas condiciones ambientales, así como con el mismo inóculo, para tratar de reducir al máximo resultados erróneos por variables externas al proceso de biodegradación estudiado. Las muestras de agua residual y un control de inóculo serán analizadas en los tiempos preestablecidos en el procedimiento consultado con objeto de evaluar el porcentaje de remoción de materia orgánica logrado, lo cual se realizará mediante el análisis de la concentración de carbono orgánico disuelto en las muestras. Adicionalmente y para fines de un mejor entendimiento del fenómeno de biodegradación, se realizará el seguimiento de algunos grupos bacterianos tróficamente activos presentes a lo largo de la prueba, así como el

estudio de los principales parámetros fisicoquímicos de interés como son: pH, oxígeno disuelto, sólidos totales y suspendidos, nitrógeno total y ortofosfatos. Como última etapa, se efectuará la identificación de algunas colonias bacterianas características empleando para ello observaciones macroscópicas, morfología microscópica y pruebas bioquímicas.

En el siguiente capítulo, se describirá ampliamente la etapa experimental previa antes mencionada.

# **CAPÍTULO CUARTO**

## **ETAPA EXPERIMENTAL**

### **PREVIA**

En este capítulo se presenta el desarrollo de la etapa experimental previa que tuvo como objetivo aprender el manejo de las técnicas analíticas para la cuantificación de parámetros fisicoquímicos y análisis bacteriológico, así como conocer el funcionamiento del respirómetro automático VOITH-Sapromat B-12 que posteriormente será empleado para el estudio y aplicación del procedimiento para la realización de la prueba de biodegradabilidad aerobia rápida. Los resultados obtenidos, permitieron tener una idea general acerca del probable comportamiento de la muestra de agua residual en estudio durante el período de biodegradación monitoreado, la población bacteriana involucrada en el proceso y el porcentaje de remoción de materia orgánica disuelta (porcentaje de biodegradación) alcanzado bajo las condiciones experimentales previamente fijadas. Una vez hecha esta aclaración; se dará paso a la descripción detallada de la etapa experimental previa, que consistió en una prueba de biodegradabilidad aerobia rápida de aguas residuales del ensilado y prensado del cempasúchil pretratadas anaerobiamente utilizando el respirómetro automático VOITH-Sapromat B-12.

#### **4.1. MATERIAL Y MÉTODOS**

##### **4.1.1. Preparación de la muestra de agua residual en estudio y obtención del inóculo**

Es importante destacar que para la selección de la muestra para la realización del ensayo; se optó por utilizar el efluente anaerobio diluido, etapa intermedia en una secuencia de tratamiento anaerobia-aerobia, de las aguas residuales provenientes del ensilado y prensado del cempasúchil a nivel de laboratorio. (Zamudio *et al.*, 1993; Armendáriz, 1998). Por tal motivo y a efecto de verificar la biodegradabilidad aerobia de dichas aguas, se decidió trabajar con esa muestra; ya que los resultados obtenidos serían también de utilidad para la integración de las propuestas de solución a este problema de contaminación ambiental.

Para la preparación de la muestra fueron colectados 1000 mL de agua residual pretratada anaerobiamente proveniente del ensilado y prensado del cempasúchil, y fueron centrifugados a 5000 rpm durante 30 minutos para eliminar las partículas suspendidas y biomasa microbiana presentes. El agua residual centrifugada tuvo un contenido de materia orgánica disuelta de

13700 mgDQO/L, por lo que lo que la concentración fue ajustada a 6050 mgDQO/L, la cual es una concentración susceptible de ser mantenida con más de 2 mgOD/L. Posteriormente, para minimizar los cambios de concentración y la carencia de uniformidad en los matraces de prueba, se incorporó el 10% de inóculo al volumen total de la muestra. El pH inicial de la mezcla fue de 8.35 unidades, por lo que se requirió ajustar a un pH cercano a valores neutros (7.24 unidades) empleando para ello una solución 0.1M de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Debe recordarse que este tipo de ajuste es necesario para favorecer las condiciones de crecimiento de los microorganismos.

El inóculo fue preparado a partir de suelo, agua de la llave, agua estancada y agua residual, con el fin de obtener la mayor diversidad microbiana posible. La mezcla anterior se mantuvo en un matraz de 500 mL tapado, en agitación constante y burbujeando con aire para garantizar la existencia de condiciones aerobias (más de 2 mgOD/L).

#### **4.1.2. Montaje de la prueba**

El estudio de biodegradación fue realizado utilizando un respirómetro automático VOITH-Sapromat B-12 bajo condiciones de temperatura, agitación y aporte de oxígeno controlado (acorde con el requerimiento de la muestra). A cada uno de los once matraces empleados se le adicionaron 250 mL de la dilución preinoculada y el doceavo matraz fue un blanco con 250 mL de agua destilada sin inóculo. Se siguió el procedimiento de montaje propuesto en la *“Guía para la operación del equipo VOITH-Sapromat B-12”* contenida dentro del Anexo B de este documento.

#### **4.1.3. Evaluación de parámetros fisicoquímicos del agua residual en estudio**

A tiempos prestablecidos (0, 3, 5, 7, 12, 14, 16, 23, 28, 33, 37 y 42 días) fue retirado un matraz para realizar la determinación de los siguientes parámetros fisicoquímicos: pH, temperatura (°C), oxígeno disuelto (O.D), sólidos totales (STT), sólidos totales volátiles (STV), sólidos totales fijos (STF), concentración de materia orgánica disuelta medida

como demanda química de oxígeno (DQO) y consumo de oxígeno medido como demanda bioquímica de oxígeno en cinco días (DBO<sub>5</sub>). En el Anexo D, se presenta la descripción de las técnicas analíticas aplicadas. Cabe señalar que el consumo de oxígeno fue monitoreado diariamente. Los tiempos de muestreo no marcados por la prueba OECD 301-A, fueron incluidos a fin de obtener más resultados que permitan construir una mejor curva de biodegradación. Asimismo, la determinación de parámetros fisicoquímicos no marcados por la prueba OECD 301-A se realizó para obtener mayor información sobre la influencia de dichos parámetros en la velocidad de oxidación de los sustratos disponibles y en los porcentajes de biodegradación alcanzados con respecto al tiempo. El análisis sistemático de la variación en las concentraciones de DQO y DBO permitió conocer la cantidad de materia orgánica disuelta remanente en solución después de un determinado tiempo de permanencia dentro del sistema, así como el porcentaje de biodegradación correspondiente a ese punto.

#### **4.1.4. Análisis bacteriológico del agua residual en estudio**

En los mismos tiempos de muestreo preestablecidos, se realizó el análisis bacteriológico del agua residual en estudio que consistió en la determinación de la cuenta total de bacterias y de los principales grupos bacterianos tróficamente activos por el método de extensión superficial (Avilés *et al.*, 1983; Ramírez-Gama *et al.*, 1992; Schade y Lemmer, 1994). La descripción más amplia de las metodologías empleadas se encuentra en el Anexo E.

Para detectar la presencia de los grupos bacterianos tróficamente activos responsables del proceso de biodegradación, fueron preparados medios de cultivo específicos para cuatro actividades enzimáticas; posteriormente, fueron inoculados con diluciones de las aguas en estudio e incubados a 35°C durante 24 y 48 horas. Los microorganismos se multiplican durante el período de incubación y exhiben una actividad enzimática específica a través de cambios producidos en la superficie del medio de cultivo. Los medios específicos utilizados para el cultivo fueron preparados de acuerdo con la literatura *ah doc* (DIFCO, 1990 y Ramírez-Gama *et al.*, 1992). A continuación se listan:

- 
- **Agar-nutritivo:** Es un medio general para la cuantificación de microorganismos mesófilos aerobios. Para ello, se deposita en la superficie de la placa una alícuota de las diluciones decimales preparadas a partir de la muestra, se distribuye y las placas son incubadas a 35°C durante 24 y 48 horas. Se cuentan todas las colonias desarrolladas sobre la superficie del medio.
  - **Agar-leche descremada:** Es el medio empleado para la cuantificación de bacterias proteolíticas. La caseína es la principal proteína de la leche, ésta como la mayoría de los coloides no permite el paso de la luz. Para demostrar la producción de caseinasa se pueden utilizar agar suplementado con una pequeña cantidad de leche. La síntesis de la enzima, su difusión al exterior y su actividad sobre el sustrato provoca pérdida de opacidad alrededor de las colonias desarrolladas en la superficie del agar, por lo que se contabilizan todas las colonias típicas con halo transparente.
  - **Agar-almidón:** Este medio se utiliza para la cuantificación de bacterias amilolíticas. El almidón contiene dos tipos de polímero de glucosa; la amilosa que consiste en cadenas largas y no ramificadas de unidades de D-glucosa conectadas por enlaces ( $\alpha 1 \rightarrow 4$ ) y con una masa molecular relativa que oscila entre unos pocos miles y 500,000. La amilopectina es también de elevada masa molecular relativa (hasta 1 millón) pero se encuentra altamente ramificada (Lehninger *et al.*, 1993). Los enlaces glucosídicos que unen residuos sucesivos de glucosa en las cadenas de amilopectina son de tipo ( $\alpha 1 \rightarrow 4$ ), pero los puntos de ramificación se producen cada 24 a 30 residuos con enlaces ( $\alpha 1 \rightarrow 6$ ). La presencia de almidón se hace evidente al agregar lugol con el que la amilosa forma un halo de color azul o morado (bacterias no amilolíticas), cuando el almidón ha sido transformado a dextrinas, algunas de éstas reaccionan con el lugol y forma un halo de color rojo o transparente (bacterias amilolíticas). Para conocer el número de bacterias amilolíticas se cuentan todas las colonias típicas con halo rojo o transparente desarrolladas sobre la superficie del medio (Ramírez-Gama *et al.*, 1992).



- **Agar-celulosa:** A través de este medio se cuantifican las bacterias celulolíticas. La celulosa es una sustancia, estable e insoluble en agua que se encuentra en las paredes celulares de plantas, tallos y tejidos vegetales leñosos. Es un polímero lineal no ramificado formado por 10,000 a 15,000 unidades de D-glucosa, los residuos tienen una configuración  $\alpha$  y están unidos mediante enlaces ( $\beta 1 \rightarrow 4$ ) glucosídicos (Lehninger *et al.*, 1993). El número de bacterias celulolíticas puede conocerse mediante la cuenta de todas las colonias desarrolladas sobre la superficie del medio, ya que el sustrato proporcionado por el papel, algodón o madera añadido al medio es la única fuente de carbono disponible.
- **Medio mínimo:** Para la cuantificación de bacterias sacarolíticas. La sacarosa es un disacárido de glucosa y fructosa, unidos covalentemente por un enlace O-glucosídico. Se sintetiza en plantas y es el producto intermedio principal de la fotosíntesis. En muchas de ellas constituye la forma principal de transporte de azúcar desde las hojas hasta otras partes de la planta (Lehninger *et al.*, 1993). Es necesario emplear medios de cultivo desprovistos de cualquier otro tipo de fuente de carbono. El punto final de este ensayo, es dado por la presencia o ausencia de colonias desarrolladas después de la inoculación e incubación de la muestra en estudio y contar todas las colonias desarrolladas sobre la superficie del medio (Ramírez-Gama *et al.*, 1992).

Para la obtención de resultados, se contó el número de colonias bacterianas presentes en la superficie de cada medio de cultivo. Se calculó la cantidad de microorganismos por mililitro de muestra y se expresó el resultado como unidades formadoras de colonias (UFC/mL).

#### 4.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De acuerdo con los resultados obtenidos, el agua residual estudiada puede ser considerada como rápidamente biodegradable bajo los criterios de la prueba de biodegradabilidad aerobia rápida OECD 301-A (OECD, 1992) y las condiciones experimentales fijadas para este caso en

particular (utilización de un respirómetro automático), debido a que se alcanzó un 78.8% de remoción de materia orgánica medida DQO en 28 días. Es necesario recordar que la condición que marca la OECD 301-A es alcanzar un 70%. Cabe destacar que el nivel de cumplimiento de dicho criterio se alcanzó desde el doceavo día (71.4%), razón para considerarlas como rápidamente biodegradables. El porcentaje de remoción de materia orgánica medida como DQO fue de 85% en 42 días (Tabla 5). Con respecto a la relación  $DBO_5/DQO$  fue de 0.66, lo que permite clasificarla como un agua residual biodegradable (Casarrubias *et al.*, 1996).

En estudios previos (Granados *et al.*, 1996) se ha demostrado que el efluente anaerobio contiene en su mayoría compuestos aromáticos como el 4-clorofenol y el 2,4-diclorofenol y, en menor proporción compuestos alifáticos de cadena larga (carotenoides). Los compuestos aromáticos anteriormente citados están clasificados respectivamente como rápida y moderadamente biodegradables (Eckenfelder y Grau, 1992; Zitomer y Speece, 1993), lo que explicaría el alto porcentaje de remoción alcanzado a lo largo del experimento. Sin embargo esta es sólo una suposición que se hace a partir de datos reportados en la literatura, por lo que resulta conveniente que se realicen análisis específicos de caracterización, por medio de técnicas cromatográficas y/o espectroscópicas de las muestras en los mismos tiempos en los que se analizaron los parámetros fisicoquímicos y grupos microbianos tróficamente activos. Lo anterior a efecto de conocer el tipo de compuestos que son biodegradados bajo condiciones aerobias y el porcentaje de remoción alcanzado para cada uno de ellos.

Por otra parte, el valor inicial de pH se ajustó cercano al neutro (Tabla 5), con el fin de proporcionar un medio adecuado para el crecimiento de las comunidades microbianas inoculadas y favorecer su adaptación durante la fase lag de crecimiento. Con lo anterior se pretende lograr el desarrollo de comunidades microbianas con adecuada actividad enzimática. Durante toda el período experimental, los valores de pH se mantuvieron básicos, oscilando entre 8.88 hasta  $9.75 \pm 0.2$  unidades. Este aumento en el pH podría deberse a la presencia de iones bicarbonato producidos por la solubilización del dióxido de carbono generado por los

microorganismos durante el proceso de biodegradación estudiado. Por otra parte, la temperatura se mantuvo constante en 20°C, tal como lo marca el procedimiento establecido en la norma OECD 301-A (OECD, 1992) ya que el respirómetro automático VOITH-Sapromat B-12 cuenta con un baño de agua controlado.

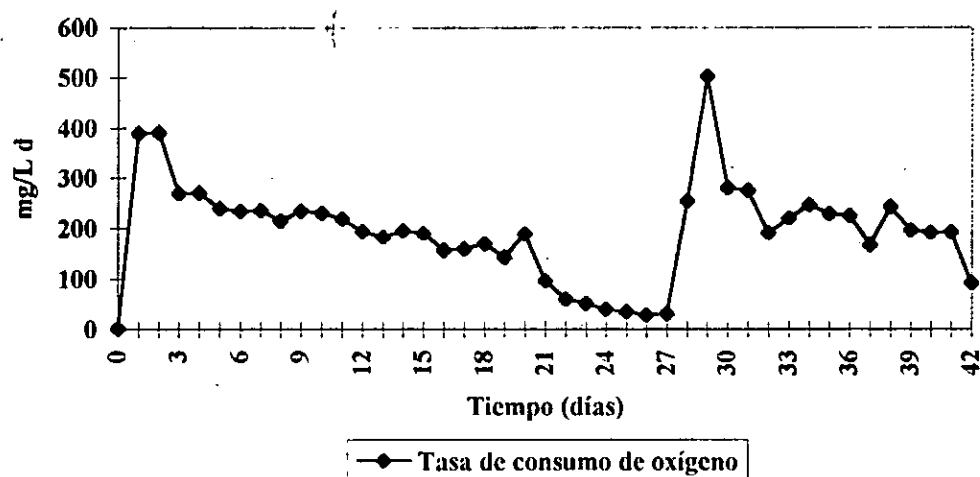
**Tabla 5. Valores promedio de los parámetros fisicoquímicos evaluados a diferentes tiempos obtenidos de la aplicación de la prueba de biodegradabilidad aerobia rápida**

Tiempo (días)	pH unidades	O.D. (mgO <sub>2</sub> /L)	STT (mg/L)	STV (mg/L)	STF (mg/L)	DQOs (mg/L)	% R DQOs acumulada	CO acum (mg/L)
0	7.24	-----	10080 ± 240	4020 ± 80	6060 ± 160	6050	0.0	0
3	8.93	0.3	9620 ± 40	4040 ± 280	5580 ± 240	3830	36.7	1051 ± 88
5	8.97	0.3	8590 ± 100	3340 ± 240	5610 ± 140	3050	49.6	1562 ± 102
7	8.91	0.3	9130 ± 60	3690 ± 60	5440 ± 0	2520	58.3	2032 ± 102
12	8.93	0.4	9140 ± 80	3440 ± 280	5700 ± 200	1730	71.4	3236 ± 110
14	8.90	1.1	9000 ± 0	3490 ± 260	5510 ± 260	1340	77.8	3506 ± 105
16	8.88	2.0	8630 ± 60	3380 ± 80	5250 ± 140	1310	78.3	3852 ± 75
23	9.03	4.6	8350 ± 140	3130 ± 260	5220 ± 120	1280	78.8	4717 ± 151
28	9.25	6.7	8260 ± 60	2273 ± 60	5987 ± 120	1280	78.8	5103 ± 171
33	9.19	7.2	8010 ± 220	2460 ± 160	5500 ± 50	1040	82.8	6573 ± 20
37	9.40	7.6	8290 ± 180	2160 ± 160	6130 ± 20	970	84.0	7442 ± 51
42	9.75	6.7	7570 ± 40	2020 ± 80	5550 ± 180	920	84.8	8354

O.D. = Oxígeno disuelto, STT = Sólidos totales totales, STV = Sólidos totales volátiles, STF= Sólidos totales fijos, DQOs= Demanda química de oxígeno soluble, CO= Consumo de oxígeno promedio acumulado, --- No se realizó la determinación

La dilución original del agua residual prácticamente carecía de oxígeno disuelto. De acuerdo a los datos reportados en la tabla 5, se registra un incremento paulatino en la concentración de oxígeno disuelto; a partir del décimosexto día se registraron concentraciones mayores de 2 mgOD/L, lo que indican la existencia de condiciones aerobias. Se observa que, conforme disminuyó la cantidad de materia orgánica disuelta, aumento la cantidad de oxígeno disuelto. Esta disminución en la cantidad de materia orgánica disuelta es consecuencia de la actividad metabólica de las poblaciones microbianas involucradas en el proceso de biodegradación. El respirómetro automático VOITH-Sapromat B-12 presenta la ventaja de proporcionar un aporte de oxígeno continuo y acorde con el requerimiento de la muestra, lo que permite mayor

solubilidad de oxígeno, al haber menor concentración de materia orgánica disuelta e iniciar y culminar con el proceso de biodegradación de todos los sustratos degradables bajo condiciones aerobias (Tabla 5). Lo anterior no ocurre en un sistema sin aporte de oxígeno, por lo que conforme transcurre el tiempo de degradación hay mayor consumo de oxígeno, originando la disminución de la concentración oxígeno disuelto existente en la muestra, hasta agotarse y provocar la muerte de los microorganismos de metabolismo aerobio e induciendo en los tipo facultativo el cambio de actividad metabólica. Es importante destacar que las desviaciones estándar del consumo de oxígeno promedio durante toda la etapa experimental, estuvieron por debajo del 10%, por lo que pueden considerarse aceptables. El comportamiento de la tasa de consumo de oxígeno (TCO) se muestra en la tabla 6 y figuras 2 y 3.



**Figura 2. Perfiles de los valores de tasa de consumo de oxígeno (TCO) durante los 42 días de duración de la prueba de biodegradabilidad aerobia rápida**

Esta tasa de consumo es la cantidad de oxígeno por día que requirieron los microorganismos para llevar a cabo la degradación de materia orgánica disuelta presente en el agua residual. Como se puede observar, durante los dos primeros días de incubación se registraron valores de TCO de casi 400 mg/L d, y durante los siguientes diez días se mantuvieron TCO de más de 200 mg/L d. Estos valores de consumo de oxígeno pueden relacionarse con la existencia de un incremento en el número de bacterias heterótrofas durante ese período, las cuales requieren de

mayor consumo de oxígeno para realizar la degradación de la materia orgánica disuelta de tipo carbonoso. En la tabla 5 puede observarse, que más del 50% de remoción lograda, se consiguió al séptimo día de incubación. El período comprendido entre los días 8 y 20 se caracteriza por un comportamiento relativamente constante en el consumo de oxígeno, con una ligera tendencia al descenso. Por otra parte, durante este mismo período la cantidad de bacterias cuantificadas a través de la cuenta total y de grupos bacterianos tróficamente activos presentó una tendencia a disminuir. Durante este intervalo de tiempo, se logró más del 78% de remoción de materia orgánica disuelta; es decir, se sobrepasó el porcentaje requerido para poder considerar la muestra evaluada como de tipo biodegradable.

A partir del día 21 y hasta el 26, se registró una caída drástica en el consumo de oxígeno, ello debido a que la abundancia de bacterias disminuye. Lo anterior, se vio reflejado en el porcentaje de remoción de materia orgánica disuelta, el cual permaneció prácticamente constante, indicando que la materia carbonosa susceptible a biodegradación aerobia ya había sido metabolizada. Sin embargo, a partir del día 27 de incubación, se observó un nuevo incremento en la tasa de consumo de oxígeno, lo cual puede atribuirse a poblaciones de microorganismos nitrificantes que oxidan el amonio a nitratos. Finalmente, durante la última fase experimental se observó que el consumo de oxígeno permanece casi constante, lográndose un porcentaje de remoción acumulado de 84.8% (Tabla 6 y Fig. 2). En este punto la concentración de oxígeno disuelto ya ha alcanzado valores propios de un sistema aerobio, ya que para que sea posible el proceso de nitrificación se requieren concentraciones de oxígeno disuelto mayores a 1 mg/L; de otra manera, el oxígeno se vuelve una condición limitante y, por lo tanto, la nitrificación es más lenta o es inhibida (Metcalf y Eddy, 1991). Adicionalmente, se ha observado que la materia orgánica disuelta en concentraciones superiores a 1000 mg/L inhibe el crecimiento de los microorganismos nitrificantes (Muxi-de-Abreu, 1994), entre los días 28 y 42 la concentración de carbono orgánico disuelto disminuyó de 1280 a 920 mg/L.

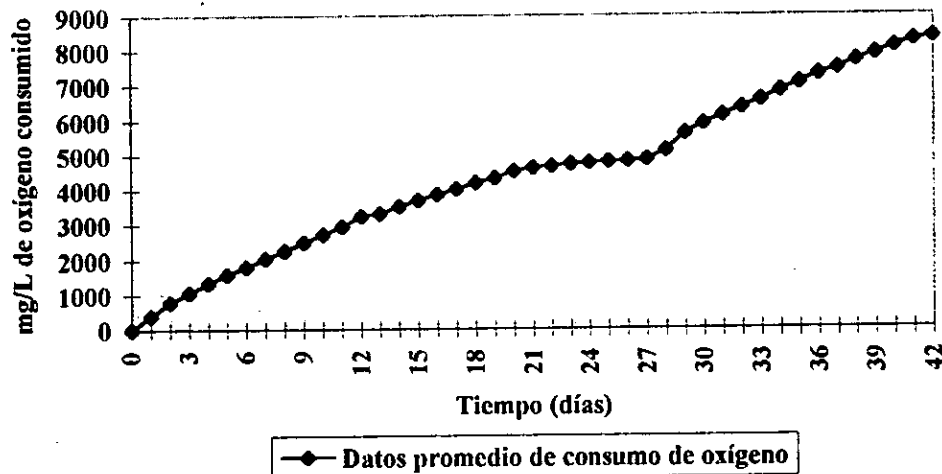
**Tabla 6. Valores del consumo de oxígeno promedio acumulado medido como DBO (mg/L) y tasa de consumo de oxígeno por día (TCO) obtenidos de la aplicación de la prueba de biodegradabilidad aerobia rápida**

Tiempo (días)	CO promedio (mg/L)	TCO (mg/L d)	Tiempo (días)	CO promedio (mg/L)	TCO (mg/L d)
0	0	0	22	4667 + 146	59
1	390 + 21	390	23	4717 + 151	50
2	781 + 51	391	24	4756 + 156	39
3	1051 + 88	270	25	4790 + 161	34
4	1322 + 113	271	26	4818 + 165	28
5	1562 + 102	240	27	4848 + 164	30
6	1796 + 113	234	28	5103 + 171	255
7	2032 + 102	236	29	5606 + 26	503
8	2248 + 94	216	30	5887 + 16	281
9	2483 + 104	235	31	6163 + 12	276
10	2714 + 113	231	32	6353 + 13	190
11	2933 + 118	219	33	6573 + 20	220
12	3127 + 110	194	34	6820 + 11	247
13	3310 + 115	183	35	7050 + 15	230
14	3506 + 105	196	36	7276 + 20	226
15	3696 + 80	190	37	7442 + 51	166
16	3852 + 75	156	38	7685	243
17	4011 + 97	159	39	7880	195
18	4180 + 103	169	40	8070	190
19	4323 + 112	143	41	8262	192
20	4512 + 123	189	42	8354	91
21	4608 + 121	96			

Nota: Debido a que se retiró un matraz en cada tiempo de muestreo pre-establecido, para el análisis de parámetros fisicoquímicos y microbiológicos, el valor de n para calcular el consumo de oxígeno promedio y la desviación estándar, disminuye conforme transcurre el tiempo de evaluación.

La velocidad de biodegradación durante la degradación de compuestos carbonosos fue de 186 mgO<sub>2</sub>/L día. Se observa que entre los días 23 y 28 prácticamente no se registró disminución en la concentración de materia orgánica medida como demanda química de oxígeno (Figs. 2 y 3). La velocidad de biodegradación durante la etapa de nitrificación fue de 220 mgO<sub>2</sub>/L día. El aumento en la tasa de consumo de oxígeno y en su velocidad de consumo el mismo puede explicarse de acuerdo a la estequiometría de la nitrificación; según la cual la oxidación de amonio a nitratos requiere de 4.33 mgO<sub>2</sub>/mg (Metcalf y Eddy, 1991). La nitrificación se da en

dos pasos, en el primero se requieren 3.22 mgO<sub>2</sub>/mg para oxidar 1 mg a 1 mg de nitritos y en el segundo, de 1.11 mgO<sub>2</sub>/mg para oxidar a 1 mg de nitratos (Sharma y Ahlert, 1977).



**Figura 3. Consumo de oxígeno promedio durante la aplicación de la prueba de biodegradabilidad aerobia rápida**

Al procesar los datos presentados en la figura 3 se obtuvo la siguiente información:

- Velocidad de consumo de oxígeno durante la etapa de degradación de sustratos carbonosos (día 8-20): 186.2 mgO<sub>2</sub>/L día.

Datos de regresión lineal: A= 848.4, B= 186.2, r= 0.9980, r<sup>2</sup>= 0.9960

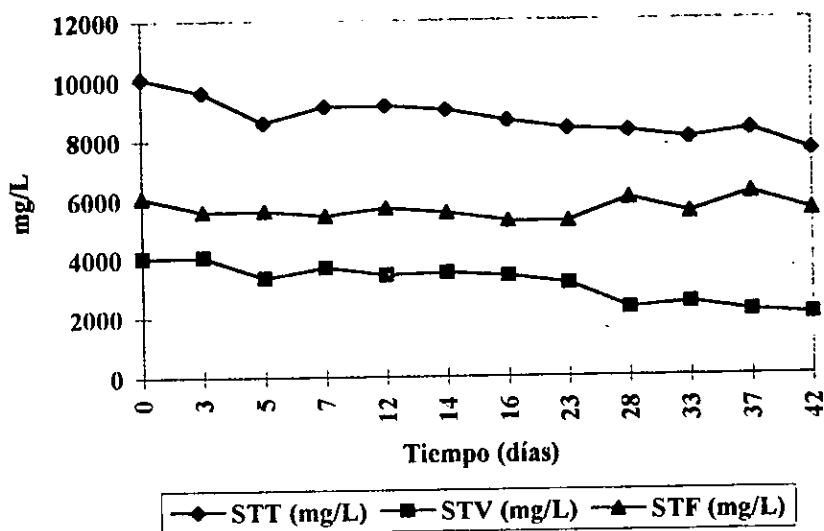
- Velocidad de consumo de oxígeno durante la etapa de nitrificación (día 30-40): 220.0 mgO<sub>2</sub>/L día.

Datos de regresión lineal: A= 687.22, B= 220.00, r= 0.9992, r<sup>2</sup>= 0.9984

donde: A = ordenada al origen, B = pendiente de la recta y r = coeficiente de correlación

Por otra parte, en cuanto a los análisis fisicoquímicos complementarios practicados, se observó que la determinación de sólidos totales en sus tres modalidades no permiten detectar la

existencia de una conversión significativa de materia orgánica a biomasa, lo que hace suponer que existió una conversión de dicha materia orgánica hacia dióxido de carbono (Tabla 5 y Fig. 4). En este punto es importante mencionar que las piedras de cal sodada contenidas dentro del matraz de reacción se sacaron mojadas, a partir del doceavo día de experimentación, lo cual coincide con el comienzo de consumo de oxígeno en el matraz blanco. Por tal motivo, hubo que restar los valores registrados en el blanco a los valores de consumo de oxígeno para cada matraz, en cada tiempo establecido para la obtención de muestras. Esto se hizo a efecto de contar con los valores absolutos de consumo de oxígeno. Finalmente, la disminución de los sólidos totales, constituye otro indicio de que los sólidos totales volátiles fueron oxidados hasta dióxido de carbono, mientras que los sólidos totales fijos (sales), permanecieron relativamente constantes.



**Figura 4. Perfil de comportamiento de los diferentes tipos de sólidos monitoreados durante la aplicación de la prueba de biodegradabilidad aerobia rápida**

Brown *et al.*, (1989) señala que en la depuración aerobia se requiere de una vasta población de microorganismos metabólicamente activos capaces de degradar productos orgánicos solubles y coloidales con una elevada tasa de conversión a dióxido de carbono y agua, lo que sería una



explicación para los resultados obtenidos. Además, si existiera un aporte adicional de nutrimentos, una parte se utilizaría en la síntesis de nueva materia microbiana o biomasa, pero como no existe dicho aporte, la cantidad de nutrimentos se vuelve limitante. En consecuencia algunos microorganismos mueren y se disgregan liberando sus componentes los cuales serán utilizados por los organismos sobrevivientes; es decir, que dichos compuestos no se incorporan al medio como biomasa. Adicionalmente, la evaluación de biodegradabilidad mediante el uso de los valores de demanda bioquímica de oxígeno es difícil, ya que la relación entre la oxidación y síntesis de biomasa difiere en algunas sustancias orgánicas y, algunas veces, la oxidación o la síntesis de biomasa pueden ser inhibidas por la sustancia de prueba (Pitter, 1974). Como se puede observar, después del vigésimo octavo día de prueba, las bacterias presentes durante el proceso de nitrificación tuvieron una baja velocidad de crecimiento (Fig. 5) y, por lo tanto, un bajo rendimiento celular a biomasa, lo cual está relacionado con una disminución progresiva en los sólidos totales totales y sólidos totales volátiles (Muxí-de-Abreu, 1994).

Con respecto al análisis bacteriológico, la cuenta en placa a 24 y 48 horas de cultivo a 35°C (Tabla 7), mostró un aumento numérico de bacterias mesófilas aerobias entre los días cero y séptimo, período durante el cual se presentó un mayor consumo de oxígeno y obtuvo un porcentaje de remoción total de 58.3% equivalente al 68% del total de remoción logrado en los 42 días que duró el experimento. La disminución de la abundancia de las mismas se observa como consecuencia del agotamiento de los sustratos disponibles existentes en el agua residual (Tebbutt, 1994).

En las cuentas practicadas a 24 horas de incubación, se observa que no se han desarrollado adecuadamente el total de colonias bacterianas presentes sobre la superficie del medio, debido a que son muy pequeñas para ser contadas; mientras que a las 48 horas de cultivo, las colonias bacterianas se han desarrollado de manera suficiente para ser visibles y contables. Es importante recordar que los tiempos de generación de los microorganismos son muy diferentes entre sí. De acuerdo con APHA (1992); las condiciones estandarizadas para este tipo de análisis incluyen la incubación de las cajas Petri a 35°C durante 48 horas. Aunque, tanto la temperatura como el

tiempo de incubación pueden variarse en función de los resultados que se pretendan obtener , así como del tipo de microorganismos que se desean cuantificar.

Los porcentajes relativos mencionados posteriormente, están en función del máximo de bacterias cuantificadas al finalizar las 48 horas de incubación (Tabla 7). El desarrollo de los grupos tróficos con distintas actividades metabólicas, puede estar relacionado con la accesibilidad y biodisponibilidad de sustratos, degradándose primero los más sencillos y al agotarse éstos, se degradan los más complejos.

A partir de los datos obtenidos, se construyeron las curvas de crecimiento bacteriano durante el proceso de biodegradación evaluado (Fig. 5):

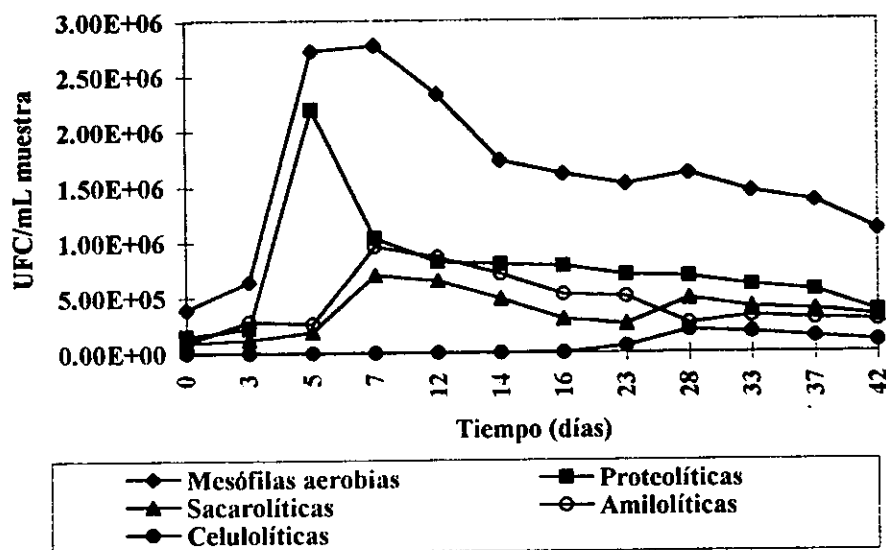


Figura 5. Cuenta total en placa y de grupos bacterianos tróficamente activos, después de 48 horas de incubación, para muestras provenientes de los diferentes matraces empleados durante la prueba de biodegradabilidad aerobia rápida

**Tabla 7. Cuenta total en placa y de grupos bacterianos tróficamente activos, después de 24 y 48 horas de incubación de muestras procedentes de la aplicación de la prueba de biodegradabilidad aerobia rápida**

Tiempo (días)	Mesófilas aerobias			Proteolíticas			Sacarolíticas			Amilolíticas			Celulolíticas		
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	
0	$3.10 \times 10^5$	$3.90 \times 10^5$	$9.8 \times 10^4$	$1.51 \times 10^5$	$2.70 \times 10^4$	$9.70 \times 10^4$	$8.20 \times 10^4$	$1.00 \times 10^5$	$1.00 \times 10^5$	$1.00 \times 10^5$	$1.00 \times 10^5$	$1.00 \times 10^5$	$1.00 \times 10^1$	$2.00 \times 10^1$	
3	$4.26 \times 10^5$	$6.40 \times 10^5$	$1.05 \times 10^5$	$2.23 \times 10^5$	$3.60 \times 10^4$	$1.20 \times 10^5$	$2.20 \times 10^5$	$2.80 \times 10^5$	$2.80 \times 10^5$	$2.80 \times 10^5$	$2.80 \times 10^5$	$2.80 \times 10^5$	$3.00 \times 10^1$	$5.00 \times 10^1$	
5	$2.52 \times 10^6$	$2.73 \times 10^6$	$1.91 \times 10^6$	$2.20 \times 10^6$	$1.18 \times 10^5$	$1.87 \times 10^5$	$1.20 \times 10^5$	$2.60 \times 10^5$	$2.60 \times 10^5$	$2.60 \times 10^5$	$2.60 \times 10^5$	$2.60 \times 10^5$	$5.00 \times 10^1$	$1.50 \times 10^2$	
7	$2.20 \times 10^6$	$2.78 \times 10^6$	$5.10 \times 10^5$	$1.03 \times 10^6$	$4.50 \times 10^5$	$7.00 \times 10^5$	$9.30 \times 10^5$	$9.60 \times 10^5$	$9.60 \times 10^5$	$9.60 \times 10^5$	$9.60 \times 10^5$	$9.60 \times 10^5$	$6.00 \times 10^1$	$3.00 \times 10^2$	
12	$1.95 \times 10^6$	$2.34 \times 10^6$	$7.30 \times 10^5$	$8.20 \times 10^5$	$3.90 \times 10^5$	$6.50 \times 10^5$	$5.20 \times 10^5$	$8.60 \times 10^5$	$8.60 \times 10^5$	$8.60 \times 10^5$	$8.60 \times 10^5$	$8.60 \times 10^5$	$8.00 \times 10^1$	$6.10 \times 10^2$	
14	$1.68 \times 10^6$	$1.73 \times 10^6$	$7.00 \times 10^5$	$8.00 \times 10^5$	$2.70 \times 10^5$	$4.80 \times 10^5$	$4.60 \times 10^5$	$7.10 \times 10^5$	$7.10 \times 10^5$	$7.10 \times 10^5$	$7.10 \times 10^5$	$7.10 \times 10^5$	$6.00 \times 10^2$	$8.00 \times 10^2$	
16	$1.32 \times 10^6$	$1.61 \times 10^6$	$6.60 \times 10^5$	$7.80 \times 10^5$	$2.28 \times 10^5$	$3.00 \times 10^5$	$3.30 \times 10^5$	$5.20 \times 10^5$	$5.20 \times 10^5$	$5.20 \times 10^5$	$5.20 \times 10^5$	$5.20 \times 10^5$	$2.00 \times 10^3$	$2.28 \times 10^3$	
23	$1.30 \times 10^6$	$1.52 \times 10^6$	$6.10 \times 10^5$	$7.00 \times 10^5$	$1.95 \times 10^5$	$2.51 \times 10^5$	$2.80 \times 10^5$	$5.00 \times 10^5$	$5.00 \times 10^5$	$5.00 \times 10^5$	$5.00 \times 10^5$	$5.00 \times 10^5$	$2.99 \times 10^4$	$5.45 \times 10^4$	
28	$1.46 \times 10^6$	$1.62 \times 10^6$	$6.00 \times 10^5$	$6.80 \times 10^5$	$3.70 \times 10^5$	$4.80 \times 10^5$	$1.60 \times 10^5$	$2.60 \times 10^5$	$2.60 \times 10^5$	$2.60 \times 10^5$	$2.60 \times 10^5$	$2.60 \times 10^5$	$1.60 \times 10^5$	$2.00 \times 10^5$	
33	$1.40 \times 10^6$	$1.45 \times 10^6$	$5.80 \times 10^5$	$6.00 \times 10^5$	$3.30 \times 10^5$	$4.00 \times 10^5$	$2.80 \times 10^5$	$3.20 \times 10^5$	$3.20 \times 10^5$	$3.20 \times 10^5$	$3.20 \times 10^5$	$3.20 \times 10^5$	$1.50 \times 10^5$	$1.80 \times 10^5$	
37	$1.22 \times 10^6$	$1.36 \times 10^6$	$4.40 \times 10^5$	$5.50 \times 10^5$	$2.90 \times 10^5$	$3.80 \times 10^5$	$2.80 \times 10^5$	$3.00 \times 10^5$	$3.00 \times 10^5$	$3.00 \times 10^5$	$3.00 \times 10^5$	$3.00 \times 10^5$	$6.40 \times 10^4$	$1.40 \times 10^5$	
42	$9.92 \times 10^5$	$1.10 \times 10^6$	$3.20 \times 10^5$	$3.60 \times 10^5$	$2.60 \times 10^5$	$3.20 \times 10^5$	$2.30 \times 10^5$	$2.80 \times 10^5$	$2.80 \times 10^5$	$2.80 \times 10^5$	$2.80 \times 10^5$	$2.80 \times 10^5$	$5.42 \times 10^4$	$1.00 \times 10^5$	
Total	$16778 \times 10^3$	$1927 \times 10^4$	$7263 \times 10^3$	$8894 \times 10^3$	$2964 \times 10^3$	$4365 \times 10^3$	$3892 \times 10^3$	$535 \times 10^4$	$535 \times 10^4$	$535 \times 10^4$	$535 \times 10^4$	$535 \times 10^4$	$46599 \times 10^4$	$67871 \times 10^4$	

A partir de la figura 5 puede afirmarse lo siguiente:

- Se observó un alto desarrollo de bacterias mesófilas aerobias ( $1927 \times 10^4$ ), las cuales para efectos del manejo de información se están considerando como el 100% de la población bacteriana. Dicho total puede ser dividido de la siguiente forma:
- El 46.1% ( $8894 \times 10^3$ ), son bacterias con actividad proteolítica; es decir, que pueden degradar proteínas, ácidos nucleicos, etcétera.
- El 27.8% ( $535 \times 10^4$ ), son bacterias con actividad amilolítica ya que degradan el almidón disponible como fuente de carbono (Fig. 5). Cuando el almidón se emplea como fuente de energía, las unidades de glucosa son eliminadas de una en una a partir de los extremos no reductores. Dada la naturaleza ramificada de la amilopectina, las enzimas pueden trabajar simultáneamente en muchos extremos, aumentando la velocidad de conversión del polímero en monosacáridos (Lehninger *et al.*, 1993).
- El 22.6% ( $4365 \times 10^3$ ), son bacterias con actividad sacarolítica, ya que degradan el disacárido sacarosa, que es la única fuente de carbono disponible en el medio de cultivo.
- El 3.5% ( $67871 \times 10^1$ ), corresponde a bacterias con actividad celulolítica, que pueden degradar el polisacárido celulosa. Se requiere que las bacterias tengan la capacidad de producir la enzima celulasa para poder utilizar este sustrato como fuente de carbono y energía (Lehninger *et al.*, 1993).

Retomando el punto anterior, las bacterias identificadas mediante su actividad proteolítica, sacarolítica y amilolítica se presentaron tróficamente activas durante todo el proceso de biodegradación estudiado, mientras que las bacterias identificadas por su actividad celulolítica se manifestaron tróficamente activas únicamente durante la fase final de la prueba de biodegradación (Armendáriz *et al.*, 1997). Es importante señalar que las colonias con actividad

---

celulolítica registraron un aumento numérico apreciable hasta después de 28 días de etapa experimental.

Después de 28 días del inicio de la etapa experimental, se presentó la nitrificación, en la cual los compuestos reducidos de nitrógeno son la fuente de energía para las bacterias autótrofas y heterótrofas que oxidan los grupos amino y nitro de compuestos inorgánicos de nitrógeno, liberándolos como nitritos o nitratos (Tórtora *et al*, 1992). Al observar las curvas de crecimiento microbiano (Fig. 5) es posible distinguir un ligero incremento en la cantidad de bacterias mesófilas aerobias y algunos grupos bacterianos tróficamente activos, específicamente sacarolíticas y celulolíticas. Finalmente, la abundancia de todas las poblaciones microbianas continúa decayendo hasta los 42 días de etapa experimental.

Por último, en la tabla 8 se presentan las características de las colonias bacterianas aisladas y la morfología microscópica de las bacterias desarrolladas en cada uno de los medios de cultivo utilizados. De acuerdo con estos datos, existen diferentes tipos de colonias cuya forma, textura y color dependen de la composición del medio de cultivo y de las condiciones de incubación. Debido a que estos datos son insuficientes para determinar que géneros y especies de bacterias están involucradas en el proceso de biodegradación aerobia de este tipo de agua residual, se recomienda que estudios posteriores contemplen la tipificación de las colonias bacterianas desarrolladas; esto a fin de profundizar en la comprensión del proceso de biodegradación aerobia que se está llevando a cabo. De acuerdo con la experiencia adquirida de la aplicación preliminar de la prueba de biodegradabilidad aerobia rápida, se elaboró el planteamiento experimental que se detalla en los siguientes capítulos.

**Tabla 8. Características morfológicas macroscópicas y microscópicas de las colonias desarrolladas en los diferentes medios de cultivo utilizados durante la prueba de biodegradabilidad aerobia rápida**

Medio de cultivo	Tipo de colonias	Tinción de Gram
Agar nutritivo	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ramificada, extendida, lisa, brillante, húmeda y cremosa</li> <li>• Ramificada, extendida, lisa, opaca, con pequeñas vellosidades</li> <li>• Circular, borde entero, lisa y opaca</li> </ul>	Negativas (cocos)
Agar leche descremada	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Blanca, circular, lisa y brillante (húmeda)</li> <li>• Blanca, ramificada, extendida, lisa y opaca</li> </ul>	Negativas (bacilos)
Agar almidón	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Amorfa, extendida, elevada, lisa y brillante, cremosa</li> <li>• Circular, lisa, opaca, seca y frágil (aparición de costra)</li> <li>• Ramificada, extendida, con pequeñas vellosidades, elevada y opaca</li> </ul>	Positivas (bacilos)
Agar celulosa	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Blanca, circular, pequeña, elevada, lisa y brillante.</li> <li>• Circular, mediana, ligeramente elevada y translúcida.</li> </ul>	Negativas (cocos)
Medio mínimo	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Circular, entera, elevada, lisa y cremosa</li> <li>• Blanca circular, entera, lisa y opaca</li> </ul>	Negativas (bacilos)

# **CAPÍTULO QUINTO**

**MATERIALES**

**Y**

**MÉTODOS**

## 5.1. APLICACIÓN DE LA PRUEBA DE BIODEGRADABILIDAD AEROBIA RÁPIDA OECD 301-A A LAS AGUAS RESIDUALES DEL ENSILADO Y PENSADO DEL CEMPASÚCHIL PRETRATADAS ANAEROBIAMENTE

### 5.1.1. Preparación de las muestras a evaluar y del inóculo microbiano

La muestra utilizada para el estudio de biodegradabilidad se obtuvo después de coleccionar agua residual procedente de la descarga de un reactor anaerobio de lecho de lodos de flujo ascendente (RALLFA) con una concentración aproximada de 17,000 mgDQO/L y un pH de 8.39 unidades. El efluente se centrifugó a 5000 rpm durante 30 minutos para minimizar la presencia de partículas suspendidas y biomasa. Una vez centrifugado, el efluente fue pasado a través de un filtro de membrana con poro de 0.45  $\mu\text{m}$ , con objeto de retirar las bacterias presentes. A continuación, se preparó una dilución con agua destilada para obtener una concentración de 557 mgDQO/L. Es importante aclarar que en primer término se determinó la concentración de DQO de la muestra de agua residual, para tener una base de cálculo para los valores de carbono orgánico disuelto, que son proporcionados como porcentajes relativos por el analizador elemental. Posteriormente, fue determinada la concentración de carbono orgánico disuelto de esta solución en un analizador elemental EA 1110 CHNS-O CE Instruments (Anexo D). La dilución empleada tuvo una concentración de 426 mgCOD/L. A partir ella se llevó a cabo la preparación de las muestras empleadas para el experimento. La concentración final de materia orgánica medida como carbono orgánico disuelto en las soluciones fue de aproximadamente 14.929 mg COD/L. Esta concentración corresponde a 14.002 mgCOD/L de la dilución de cempasúchil y el 8.5% restante (0.927 mgCOD/L) de dicho valor es el aportado por el inóculo, agua y medio mineral.

Otra cuestión que debe ser aclarada en este punto es el uso de una concentración de carbono orgánico disuelto tan baja (14 mgCOD/L). Las normas consultadas marcan una concentración entre 10 y 40 mgCOD/L; sin embargo, hay que recordar que a las condiciones de la Ciudad de México, sólo se pueden tener 7 mgOD/L y para que el proceso de biodegradación se lleve a cabo bajo condiciones aerobias deben existir por lo menos 2 mgOD/L. Por lo tanto, si se utilizan muestras más concentradas, el oxígeno disuelto será consumido rápidamente por los

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**



microorganismos y es poco probable que el proceso de biodegradación con 28 días de duración se realice de manera satisfactoria. En el caso de las muestras evaluadas con el respirómetro automático, no existe esta limitante, pero se ensayó la misma concentración a efecto de contar con un parámetro de comparación para el análisis y discusión de los resultados obtenidos. De acuerdo a la composición marcada por la prueba OECD 301-A (Anexo A.1) fueron preparados 8.5 L de medio mineral. Dicho medio fue mantenido en aireación durante 1 hora para asegurar que cuente con la mayor concentración de oxígeno disuelto posible al momento de preparar las soluciones de prueba, las cuales se introducirán en los matraces de reacción del respirómetro y en las botellas Winkler que se pondrán en la incubadora. Cabe señalar que, para minimizar posibles errores y variaciones debidas a manejo experimental, las soluciones fueron preparadas al mismo tiempo y bajo las mismas condiciones. Las soluciones fueron preparadas de acuerdo a lo establecido en la OECD 301-A (Anexo A.1); la composición exacta de cada solución se describe tabla 9. El pH de la soluciones fue ajustado a aproximadamente 7.2 unidades empleando una solución de  $H_2SO_4$  0.1M. La relación de matraces y botellas inoculadas, se presenta en la tabla 9.

**Tabla 9. Composición de las soluciones preparadas para el estudio de biodegradabilidad**

Número de matraces y/o botellas	Solución	Composición
1	Control de procedimiento	2.9 mL de acetato de sodio + 80 mL de inóculo + 720 mL de medio mineral
4	Control de inóculo	245 mL de inóculo + 2205 mL de medio mineral
4	Sustancia de prueba	245 mL de inóculo + 790 mL de dilución de cempasúchil + 2125 mL de medio mineral
1	Control de toxicidad	2.9 mL de acetato de sodio + 80 mL de inóculo + 25.8 mL de dilución de cempasúchil + 692 mL de medio mineral
1	Control de adsorción	80 mL de inóculo + 25.8 mL de dilución de cempasúchil + 693.4 mL de medio mineral + 0.8 mL de $HgCl_2$
1	Control de degradación abiótica	25.8 mL de dilución de cempasúchil + 773.4 mL de medio mineral + 0.8 mL de $HgCl_2$

Asimismo, fueron preparadas una solución de acetato de sodio y una solución de cloruro de mercurio (II) de acuerdo con lo establecido en las normas consultadas (Anexo A). La solución de acetato de sodio se utilizó como sustancia de referencia para el control de procedimiento, su concentración fue de 5,560 mgDQO/L lo que resultó equivalente a 4,853 mg COD/L, después de realizar la determinación de carbono orgánico disuelto en el analizador elemental EA 1110 CHNS-O CE Instruments.

El inóculo fue preparado partir de agua residual proveniente de las cámaras aerobias del reactor biológico rotatorio de nejayote, así como de agua de la llave, con el fin de garantizar una diversidad microbiana adecuada para realizar el proceso de biodegradación. La mezcla anterior se mantuvo en un matraz de 500 mL sellado, con aireación y agitación constantes durante 5 días para garantizar su viabilidad. El inóculo fue filtrado a través de papel filtro de poro mediano para eliminar partículas en suspensión gruesas y, posteriormente, fue lavado tres veces con solución salina isotónica, con objeto de asegurar que estuviera libre de sustratos que pudieran elevar la concentración inicial de carbono orgánico disuelto. Finalmente fue resuspendido en 800 mL solución salina isotónica y conservado en aireación y agitación hasta su uso. El inóculo microbiano presentó las siguientes características (Tabla 10).

**Tabla 10. Características fisicoquímicas y microbiológicas del inóculo microbiano empleado**

Parámetro	Concentración
Sólidos suspendidos totales	900 mg/L
Sólidos suspendidos volátiles	667 mg/L
Sólidos suspendidos fijos	233 mg/L
Bacterias mesófilas aerobias	$2.23 \times 10^6$ UFC/mL

### 5.1.2. Modificaciones realizadas a los procedimientos previamente consultados

De acuerdo con el análisis previo de las pruebas de biodegradabilidad aerobia rápida consultadas (Anexo A.1 y A.2) las modificaciones y/o adecuaciones efectuadas a los procedimientos establecidos fueron:

- Utilización de un respirómetro automático VOITH-Sapromat B-12, el cual proporciona aporte de oxígeno continuo y acorde con el requerimiento de cada muestra; por lo que se asegura que el proceso de biodegradación se llevará a cabo de acuerdo con el fundamento de biodegradación aerobia (por lo menos 2 mg oxígeno disuelto/L).
- Lavar el inóculo microbiano con solución salina isotónica a efecto de que al añadir el inóculo al medio mineral no se incremente la concentración de carbono orgánico disuelto debido a la presencia de otros sustratos. La solución salina isotónica no cambia la tonicidad del medio, por lo que disminuye el riesgo de que los microorganismos sufran un choque osmótico durante el lavado y, como consecuencia, pierdan su viabilidad.
- En el caso de la aplicación de la prueba de acuerdo con el procedimiento marcado en la norma OECD 301-A, fueron utilizadas botellas Winkler, mismas que cuentan con un tapón de vidrio que al contacto con la solución forman un “sello de agua”. Por lo tanto, se cuenta con un sistema hermético, lo que evita la pérdida de agua por evaporación.
- Debido a que en este experimento fueron incluidas determinaciones de parámetros fisicoquímicos y microbiológicos no consideradas como parte de la prueba OECD 301-A; fue necesario separar y sacrificar una botella con sustancia de prueba y con control de inóculo en cada punto evaluado. En el caso de la aplicación de la prueba de biodegradabilidad aerobia rápida, utilizando el respirómetro automático VOITH-Sapromat B-12, es necesario separar y sacrificar un matraz cada vez que se requiera hacer una determinación, debido a que se consideró que no era recomendable volver a conectar el matraz después de ser retirado del sistema.
- Una vez preparado el medio mineral, éste se mantuvo en aireación durante 1 hora antes de proceder a preparar las soluciones de prueba y añadir el inóculo. Lo anterior se realizó a efecto de contar con la mayor concentración de oxígeno disuelto en el medio mineral que

permitiera a los microorganismos realizar la biodegradación del sustrato bajo condiciones aerobias (más de 2 mgOD/L).

### **5.1.3. Parámetros fisicoquímicos complementarios a evaluar durante la aplicación de la prueba OECD 301-A**

En este experimento fueron incluidas determinaciones de parámetros fisicoquímicos complementarios, a fin de obtener datos que permitieran evaluar mejor el proceso de biodegradación estudiado, así como reconocer su influencia en la velocidad de oxidación de sustratos y el porcentaje de biodegradación alcanzado con respecto del tiempo. Los parámetros fisicoquímicos complementarios considerados en esta etapa experimental fueron:

- Medición potenciométrica del pH
- Oxígeno disuelto (O.D). Método 4500-O-G APHA
- Sólidos totales (STT), totales volátiles (STV) y totales fijos (STF). Método 2540 B y E APHA
- Sólidos suspendidos totales (SST), suspendidos fijos (SSF) y suspendidos volátiles (SSV) (estos tres últimos sólo en el caso de las muestras de sustancia de prueba). Método 2440 D APHA
- Nitrógeno total (analizador elemental EA 1110 CHNS-O CE Instruments)
- Ortofosfatos. Método 4500-P-C APHA

En el Anexo D, se presenta la descripción detallada de las técnicas analíticas aplicadas.

### **5.1.4. Análisis bacteriológico a realizar durante la aplicación de la prueba OECD 301-A**

De igual manera y en los mismos tiempos de muestreo preestablecidos para el monitoreo de parámetros fisicoquímicos, se llevó a cabo la determinación de la cuenta total de bacterias y de los principales grupos bacterianos tróficamente activos, para muestras procedentes de los dos sistemas (incubadora y respirómetro) donde se realizó la prueba de biodegradabilidad aerobia

rápida OECD 301-A. Para la realización de la cuenta se aplica el método de extensión superficial (Schade y Lemmer, 1994). Estas determinaciones no están incluidas dentro del procedimiento establecido por la OECD 301-A y fueron realizadas a fin de profundizar en el estudio de las comunidades bacterianas involucradas en el proceso de biodegradación aerobia del agua residual bajo estudio. Para ello, se siguió el mismo procedimiento que el descrito en la etapa experimental previa (Capítulo 4 y Anexo E). Las cajas fueron incubadas a 35°C por 24 y 48 horas de acuerdo con lo establecido en el método 9215 de la APHA, denominado "*Recuento heterótrofo en placa*" (APHA, 1992). Las colonias pueden surgir en pares, cadenas grupos o como células únicas; no obstante todas se engloban bajo el nombre de unidades formadoras de colonias (UFC). Posteriormente, para su determinación se selecciona una caja de cada medio de cultivo procedente de los dos sistemas donde se realizó la prueba de biodegradabilidad aerobia OECD 301-A. Las colonias bacterianas seleccionadas fueron sembradas por agotamiento en placas que contenían el medio de cultivo específico donde se desarrollaron originalmente, fueron incubadas durante 24 h a 35°C; una vez cotejada su actividad de acuerdo con los medios de cultivo específicos utilizados, fueron conservadas en refrigeración a 4°C hasta el inicio de la secuencia de tipificación.

#### **5.1.5. Montaje usando el procedimiento indicado en la prueba OECD 301-A**

El estudio de biodegradación fue realizado empleando botellas Winkler y una incubadora orbital, la cual proporciona condiciones de temperatura y agitación controlada en ausencia de luz. En este caso, no existió un aporte de oxígeno continuo a lo largo del experimento. A cada una de las doce botellas Winkler empleadas se le adicionaron 300 mL de la dilución preinoculada. El montaje de la prueba se hizo siguiendo el procedimiento propuesto por la prueba OECD 301-A. Después de que las botellas fueron cerradas y colocadas en la incubadora, se fueron sacando a tiempos preestablecidos (0, 7, 14, 21 y 28 días), una botella de control de inóculo y una botella de sustancia de prueba, con objeto de determinar la concentración de carbono orgánico disuelto y calcular el porcentaje de remoción de materia orgánica disuelta alcanzado en cada punto de control.

Adicionalmente, se realizó la determinación de parámetros fisicoquímicos no incluidos en la norma OECD 301-A, así como el análisis bacteriológico correspondiente. Asimismo y durante esos mismos tiempos de muestreo, se tomó 1 mL de las botellas marcadas como control de procedimiento; control de toxicidad; control de adsorción y control de degradación abiótica, para el posterior análisis de carbono orgánico disuelto. El volumen de solución tomado de cada botella fue compensado mediante la adición de agua destilada.

#### **5.1.6. Montaje usando el respirómetro automático VOITH Sapromat B-12**

El estudio de biodegradación en este caso, fue realizado en un respirómetro VOITH-Sapromat B-12 bajo condiciones de ausencia de luz, temperatura, agitación controlada y con aporte de oxígeno acorde con el requerimiento de la muestra. A cada uno de los doce matraces empleados se le adicionaron 250 mL de la dilución preinoculada. Para el uso de este equipo, se siguió el procedimiento de montaje propuesto en la *"Guía para la operación del equipo VOITH-Sapromat B-12"* (Anexo B). A tiempos preestablecidos (0, 7, 14, 21 y 28 días), se sacó un matraz de control de inóculo y un matraz de sustancia de prueba para determinar la concentración de carbono orgánico disuelto, con objeto de calcular el porcentaje de remoción de materia orgánica disuelta alcanzado en cada punto de control.

Complementariamente, se realizó la determinación de parámetros fisicoquímicos no incluidos en la norma OECD 301-A, así como el análisis bacteriológico correspondiente. El consumo de oxígeno fue evaluado diariamente. Debido a que en este equipo no es recomendable desconectar y sacar los matraces para tomar muestras a lo largo del periodo de prueba, no fue posible evaluar los controles de procedimiento; toxicidad; adsorción y degradación abiótica, por lo que sólo se dan los resultados obtenidos al final del periodo de prueba.

#### **5.1.6. Tipificación de las colonias bacterianas seleccionadas**

Al respecto, a continuación se describe brevemente el procedimiento seguido para la tipificación de las colonias bacterianas seleccionadas. La descripción detallada de las técnicas empleadas, así como de los medios de cultivo utilizados para la realización de las pruebas

bioquímicas se encuentra en el Anexo E y en la bibliografía consultada (Mac Faddin, 1990 Koneman *et al.*, 1992 ; Ramírez-Gama *et al.*, 1992).

- Realizar tinción de Gram a todas las colonias seleccionadas
- Resembrar por agotamiento en agar de tripticaseína-soya (TSA). Incubar a 35°C por 24 horas.
- Realizar tinción de Gram a colonias aisladas. Con base a este criterio, dividir las colonias bacterianas en Gram positivas y negativas. Observar morfología microscópica (cocos, bacilos), tipo de agrupación (cadenas, racimos) y estructuras especiales (por ejemplo, presencia de esporas).
- Resembrar por agotamiento las colonias Gram negativas en agar Mac Conkey (MC). Incubar a 35°C por 24 horas.
- Realizar la observación de las características de las colonias en medio sólido (forma, elevación, color, bordes, etcétera).
- Preparar pruebas bioquímicas para las bacterias Gram negativas:
  - \* Metabolismo de carbohidratos (rojo de metilo, Vogues Proskauer, citrato de Simmons, hidrólisis de almidón, leche tornasol)
  - \* Metabolismo de compuestos nitrogenados (reducción de nitratos, fenilalanina desaminasa, lisina descarboxilasa y ornitina descarboxilasa)
  - \* Otras pruebas: TSI (triple azúcar) y SIM (Sulfhídrico, indol y movilidad)
- Integrar los resultados obtenidos

Por último, en la figura 6 se presenta un diagrama de flujo que esquematiza el procedimiento general seguido para el montaje de las pruebas de biodegradabilidad aerobia rápida.

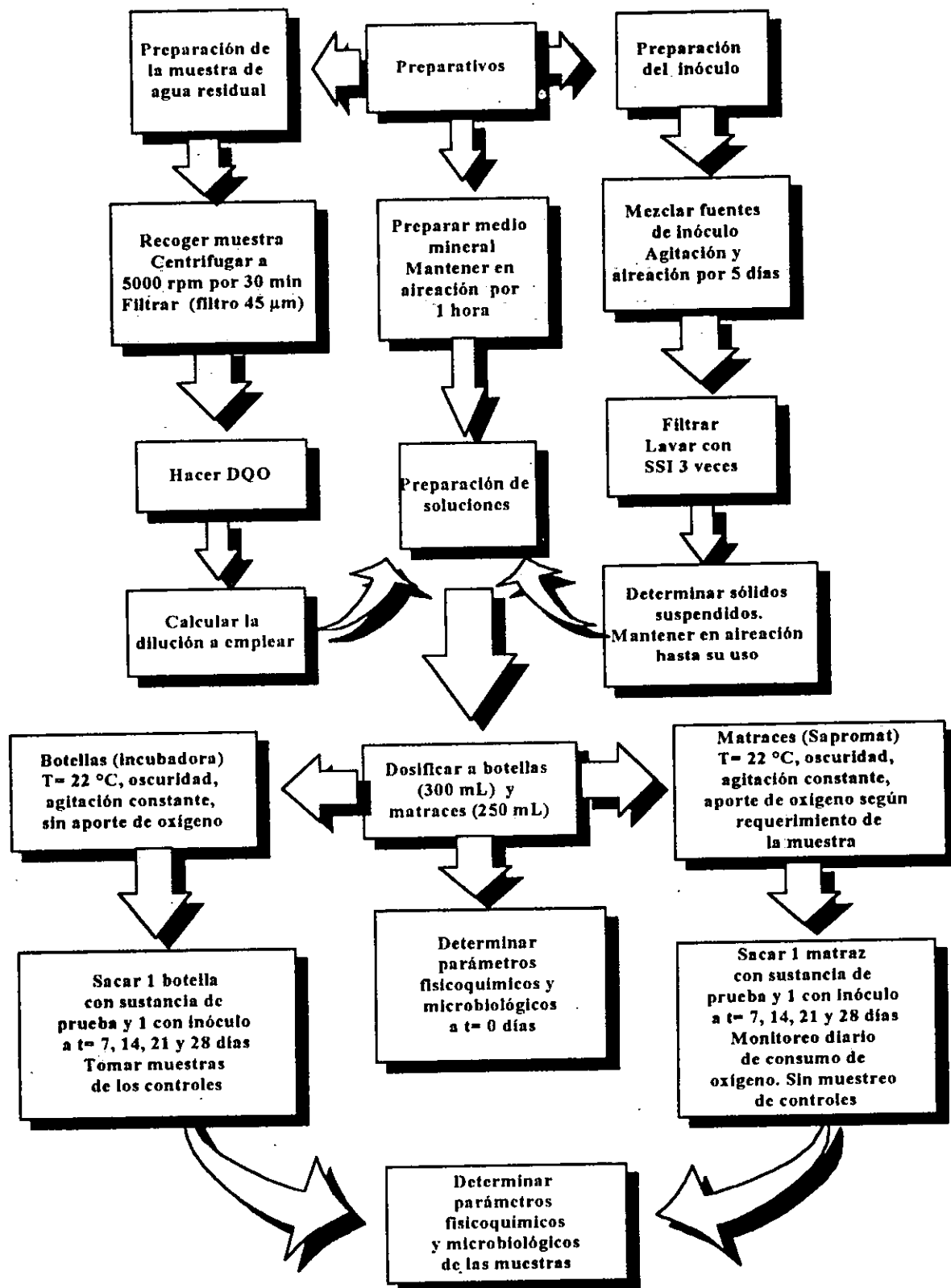


Figura 6. Diagrama general del montaje de la prueba OECD 301- A



# **CAPÍTULO SEXTO**

## **RESULTADOS, ANÁLISIS**

### **Y DISCUSIÓN**

En este capítulo, se encuentran las tablas de resultados del monitoreo de parámetros fisicoquímicos y análisis bacteriológico obtenidos a partir de la aplicación de la prueba de biodegradabilidad aerobia OECD 301-A.

A efecto de simplificar y homogeneizar la nomenclatura tanto para la presentación de resultados como para su posterior análisis y discusión, se optó por denominar a la prueba de biodegradabilidad aerobia rápida realizada de acuerdo con el procedimiento establecido por la OECD 301-A, utilizando las botellas Winkler y la incubadora con agitación como **PRUEBA OECD 301-A NO MODIFICADA**.

De igual forma, en el caso de la prueba de biodegradabilidad aerobia rápida realizada de acuerdo con el procedimiento establecido por la OECD 301-A, pero utilizando un respirómetro automático VOITH-Sapromat B-12, se denomina como **PRUEBA OECD 301-A MODIFICADA**.

En el siguiente inciso se presentan los resultados, así como el análisis y discusión correspondiente a la prueba de biodegradabilidad aerobia rápida OECD 301-A no modificada empleando las botellas Winkler y la incubadora.

### **6.1. PRUEBA DE BIODEGRADABILIDAD AEROBIA OECD 301-A NO MODIFICADA**

De acuerdo con los resultados obtenidos (Tablas 11 y 13), el agua residual estudiada no puede ser considerada como rápidamente biodegradable, bajo los criterios de la prueba de biodegradabilidad aerobia rápida OECD 301-A (OECD, 1992) y las condiciones experimentales fijadas para este caso en particular. Lo anterior se debe a que se alcanzó solamente un 68.2% de remoción de materia orgánica medida como carbono orgánico disuelto (Tabla 11) al término de los 28 días establecidos y no el 70% estipulado en las normas consultadas.

**Tabla 11. Porcentaje de remoción de carbono orgánico disuelto (COD) en el agua residual sometida a la prueba OECD 301-A no modificada**

Tiempo (días)	Porcentaje de remoción de COD acumulado (%)
7	28.3
14	47.2
21	62.0
28	68.2

Asimismo, la evaluación de los controles a lo largo de los 28 días de la etapa experimental, demostró el cumplimiento de los criterios de validez (Anexo A), para la prueba de biodegradabilidad aerobia rápida OECD 301-A (Tabla 12). Uno de los criterios de validez para la aceptación de la prueba es que el control de toxicidad alcance por lo menos un 35% de remoción de carbono orgánico disuelto en 15 días. Como se puede observar, esta condición sí se cumplió, por lo que se puede afirmar que la sustancia de prueba no fue tóxica para los microorganismos, al menos a la concentración ensayada. En el control de procedimiento se establece que debe alcanzarse al menos un 70% de remoción de carbono orgánico disuelto en 14 días (Anexo A), lo cual también se cumplió. De esta manera, se pudo comprobar que el desarrollo de la etapa experimental y la viabilidad del inóculo microbiano empleado para la realización de la prueba de biodegradabilidad aerobia rápida eran válidos.

**Tabla 12. Porcentaje de remoción de carbono orgánico disuelto en los controles empleados durante la prueba OECD 301-A no modificada**

Muestra/Tiempo	7 días	14 días	21 días	28 días
Control de procedimiento	48.3 %	72.5 %	74.4 %	81.9 %
Control de toxicidad	34.2 %	51.6 %	61.0 %	79.3 %
Control de adsorción	8.3 %	15.1 %	23.2 %	37.0 %
Control de degradación abiótica	0.8 %	1.3 %	2.4 %	3.6 %

La dilución de agua residual denominada como sustancia de prueba, así como todos los controles preparados (Tabla 13) tenían al inicio del experimento concentraciones de oxígeno disuelto propias de un sistema aerobio. La concentración de oxígeno disuelto presente en las

muestras con sustancia de prueba e inóculo a lo largo del experimento fue disminuyendo paulatinamente hasta que registró valores por debajo de 2.0 mg O<sub>2</sub>/L (Tabla 13 y Fig. 15); por lo que no todo el proceso de biodegradación se realizó con la presencia de una concentración adecuada de oxígeno molecular libre. Esta condición es determinante para el crecimiento microbiano y para el proceso de biodegradación aerobio por lo que es razón suficiente para que no se haya alcanzado el porcentaje de remoción de materia orgánica medida como carbono orgánico disuelto para considerar a la sustancia de prueba como rápidamente biodegradable. La disminución en la concentración de oxígeno disuelto fue observada en todos los matraces control, sólo el matraz control de degradación abiótica permaneció bajo condiciones aerobias; sin embargo, hay que recordar que ese matraz fue esterilizado con cloruro de mercurio y no contenía inóculo. Se comprueba por lo tanto, que la actividad metabólica del inóculo durante la asimilación de las sustancias orgánicas, provoca el agotamiento del oxígeno disuelto, y al disminuir dicha concentración, el proceso de biodegradación aerobia no puede llevarse a cabo de manera eficiente.

En la tabla 13 y figura 16, puede observarse que el valor de pH inicial se ajustó a un valor cercano al neutro, con el fin de proporcionar un medio adecuado para los microorganismos y favorecer su adaptación durante la fase latente de crecimiento microbiano. Lo anterior pretende lograr el desarrollo de comunidades microbianas con actividad enzimática adecuada. Cabe recordar que el medio mineral empleado en esta prueba incluye un amortiguador de fosfatos (Anexo A). El sistema amortiguador de fosfatos (H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>/HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>), actúa en el citoplasma de todas las células y presenta su efectividad máxima a un pH próximo a su valor de pka de 6.86; por lo tanto, tiende a resistir cambios de pH en un intervalo entre 6.4 y 7.4 unidades (Lehninger *et al.*, 1993). Durante todo el experimento, los valores de pH fueron cercanos al neutro, oscilando ligeramente entre 7.10 y 7.37 unidades, tanto para la sustancia de prueba como para el control de inóculo. Una probable explicación a estos resultados es que la capacidad amortiguadora del sistema de fosfatos no es rebasada.

Tabla 13. Valores promedio de los parámetros fisicoquímicos evaluados a diferentes tiempos de muestreo obtenidos de la aplicación de la prueba OECD 301-A no modificada

Parámetro/ Muestra	pH unidades	O.D. (mg/L)	STT (mg/L)	STV (mg/L)	STF (mg/L)	SST (mg/L)	SSV (mg/L)	SSF (mg/L)	COD (mg/L)	NT (mg/L)	P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (mg/L)
Control de inóculo (ini)	7.20	6.6	915 ± 91	400 ± 113	515 ± 35	-----	-----	-----	0.927 ± 0.064	0.0	110
Sustancia de prueba (ini)	7.17	6.6	980 ± 198	450 ± 212	530 ± 14	140 ± 71	65 ± 28	75 ± 48	14.929 ± 2.027	10.791 ± 1.294	148
Control de procedimiento (ini)	7.17	6.6	730 ± 127	70 ± 14	660 ± 141	-----	-----	-----	14.073 ± 0.672	11.233 ± 1.64	-----
Control de adsorción (ini)	7.15	6.4	720 ± 14	70 ± 14	650 ± 28	-----	-----	-----	14.929 ± 2.027	10.912 ± 0.452	-----
Control de toxicidad (ini)	7.11	6.4	810 ± 14	70 ± 14	740 ± 28	-----	-----	-----	29.0 ± 0.805	10.794 ± 1.294	-----
Control de degradación abiótica (ini)	7.24	6.8	780 ± 0	90 ± 14	690 ± 14	-----	-----	-----	14.002 ± 0.207	10.791 ± 1.294	-----
Sustancia de prueba (7 d)	7.10	4.8	1440 ± 71	940 ± 71	500 ± 42	233 ± 0	33 ± 0	200 ± 0	10.716 ± 2.619	11.382 ± 0.085	55
Control de inóculo (7 d)	7.12	5.0	890 ± 71	320 ± 28	550 ± 14	-----	-----	-----	0.672 ± 0.032	0.067 ± 0.013	78
Sustancia de prueba (14 d)	7.37	3.8	890 ± 14	380 ± 0	510 ± 14	90 ± 42	60 ± 28	30 ± 14	7.946 ± 2.152	11.414 ± 0.085	38
Control de inóculo (14 d)	7.33	4.2	850 ± 71	290 ± 14	560 ± 28	-----	-----	-----	0.550 ± 0.021	0.086 ± 0.048	52

ini = inicial, d = días, O.D. = Oxígeno disuelto, STT = Sólidos totales, STV = Sólidos volátiles, STF = Sólidos totales fijos, SST = Sólidos suspendidos totales, SSV = Sólidos suspendidos volátiles, SSF = Carbono orgánico disuelto, COD = Carbono orgánico disuelto, NT = Nitrogeno total, P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> = Ortofosfatos, ----- No se realizó la determinación

Continuación Tabla 13. Valores promedio de los parámetros fisicoquímicos evaluados a diferentes tiempos de muestreo obtenidos de la aplicación de la prueba OECD 301-A no modificada

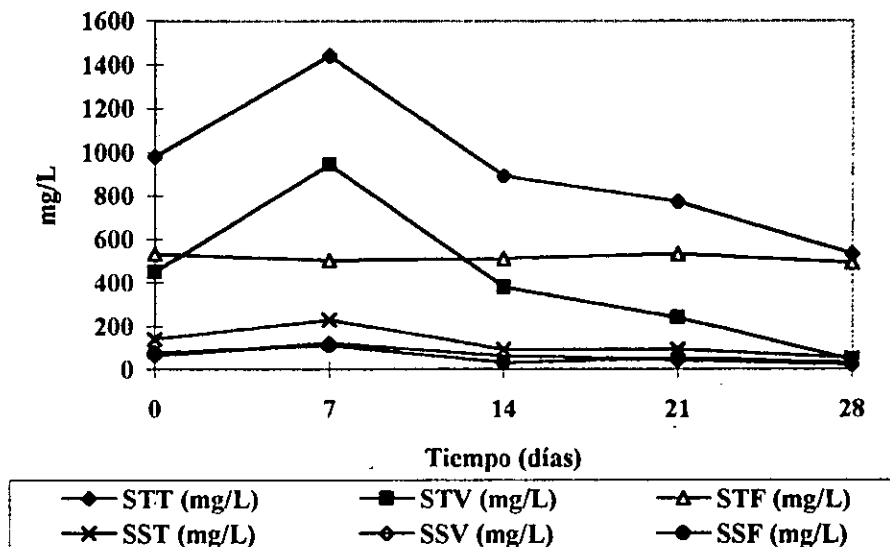
Parámetro/ Muestra	pH unidades	O.D. (mg/L)	STT (mg/L)	STV (mg/L)	STF (mg/L)	SST (mg/L)	SSV (mg/L)	SSF (mg/L)	COD (mg/L)	NT (mg/L)	P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (mg/L)
Control de inóculo (21 d)	7.28	2.6	800 ± 85	250 ± 71	550 ± 14	-----	-----	-----	0.543 ± 0.031	0.099 ± 0.053	51
Sustancia de prueba (21 d)	7.26	2.4	770 ± 14	240 ± 28	530 ± 14	90 ± 14	50 ± 28	40 ± 14	5.863 ± 0.997	11.467 ± 0.07	41
Control de inóculo (28 d)	7.11	1.8	600 ± 0	60 ± 28	540 ± 28	-----	-----	-----	0.542 ± 0.119	0.105 ± 0.020	66
Sustancia de prueba (28 d)	7.25	1.6	530 ± 42	40 ± 0	490 ± 42	50 ± 14	30 ± 0	20 ± 14	5.000 ± 0.148	11.804 ± 0.389	78
Control de procedimiento (28 d)	7.27	1.8	730 ± 14	180 ± 28	550 ± 42	-----	-----	-----	2.786 ± 0.282	11.54 ± 0.495	-----
Control de adsorción (28 d)	7.29	1.6	710 ± 42	60 ± 28	650 ± 28	-----	-----	-----	8.961 ± 1.183	11.201 ± 0.438	-----
Control de toxicidad (28 d)	7.21	1.8	700 ± 0	60 ± 28	640 ± 28	-----	-----	-----	6.406 ± 0.595	11.113 ± 0.467	-----
Control de degradación abiótica (28 d)	7.26	5.4	780 ± 0	50 ± 14	730 ± 14	-----	-----	-----	13.498 ± 0.295	11.012 ± 0.749	-----

ini = inicial, d = días, O.D. = Oxígeno disuelto, STT = Sólidos totales, STV = Sólidos totales volátiles, STF = Sólidos totales fijos, SST = Sólidos suspendidos fijos, SSV = Sólidos suspendidos volátiles, SSF = Sólidos suspendidos fijos, COD = Carbono orgánico disuelto, P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> = Ortofosfatos, ----- No se realizó la determinación

De igual manera, debido a que la velocidad de oxidación de los sustratos disponibles fue baja, acorde con los porcentajes de remoción de materia orgánica alcanzados (Tabla 11), la producción de dióxido de carbono a partir de la respiración microbiana debió ser baja. En consecuencia, su disolución en el medio acuoso no afectó excesivamente el sistema amortiguador bicarbonato/ácido carbónico, el cual es eficiente a valores de pH cercanos a 7.4 unidades y, por lo tanto, no existen las condiciones para producir altas concentraciones de iones bicarbonato en solución que puedan desplazar el valor de pH a valores alcalinos. Finalmente, el pH de los controles empleados también permaneció en el intervalo cercano a la neutralidad, hecho que refuerza la explicación del comportamiento del pH con base en una menor producción de dióxido de carbono, como resultado de la menor velocidad de oxidación de los sustratos disponibles. La temperatura se mantuvo constante en 22°C, tal como lo marca la prueba OECD 301-A (OECD, 1992) debido a que las muestras se mantuvieron en la incubadora.

La determinación de sólidos totales en sus tres modalidades (Tabla 13 y Fig. 7) permitió detectar la conversión de materia orgánica a biomasa relacionado con el aumento de los sólidos totales volátiles al evaluar este parámetro a los 7 días de experimento. Este incremento también estuvo relacionado con el incremento en la cuenta de mesófilos aerobios y de todos los grupos bacterianos tróficamente activos evaluados. A partir del día 14 y hasta el final del período experimental evaluado, la concentración de sólidos totales fue disminuyendo poco a poco. Al analizar los resultados, es posible apreciar que la concentración de sólidos totales volátiles es la que disminuye, mientras que los sólidos totales fijos presentaron una tendencia a permanecer casi constantes; (esto permite suponer que hubo una proporción de materia orgánica disuelta, que fue mineralizada hasta dióxido de carbono no cuantificado). El dióxido de carbono puede solubilizarse en medio acuoso y contribuye con el sistema amortiguador bicarbonato/ácido carbónico a mantener el pH de la solución en valores cercanos a la neutralidad. Por otra parte, no existió aporte adicional de nutrimentos, por lo que ellos se convierten en un factor limitante. Es posible suponer, con base en estos datos, que se presentó la llamada fase de crecimiento endógeno. En ella, los microorganismos son forzados a

metabolizar su propio protoplasma sin que exista reemplazo alguno; porque la concentración de nutrientes disponible es mínima, ello ocasiona una disminución neta de la biomasa microbiana. Durante esta fase, frecuentemente ocurre el fenómeno de lisis celular, durante la cual los microorganismos se disgregan y los nutrientes contenidos en la célula, pueden difundirse para suministrar alimento a los microorganismos sobrevivientes; es decir, no se incorporan al medio como biomasa microbiana propiamente dicha. Este fenómeno es conocido como crecimiento críptico (Metcalf y Eddy, 1991).



**Figura 7. Perfil de comportamiento de los sólidos totales y suspendidos presentes en las muestras sometidas a la prueba OECD 301-A no modificada**

En el caso de los matraces de control de inóculo (Tabla 13), la evaluación de sólidos totales permitió observar el descenso en las concentraciones de éstos en sus tres modalidades. Lo anterior puede explicarse en función del metabolismo endógeno ocurrido. Adicionalmente, el comportamiento de los sólidos en los matraces de control empleados, sólo pudo ser seguido al inicio y al final de la pruebas; sin embargo al analizar los resultados de los dos puntos muestreados, se aprecia que la tendencia fue la misma que la observada en las botellas con sustancia de prueba. Es decir que los sólidos totales disminuyeron al igual que los



sólidos totales volátiles. Los sólidos totales fijos también disminuyeron ligeramente, pero su valor fue muy similar al obtenido en las muestras evaluadas durante los tiempos de muestreo preestablecidos. Por tal motivo, se supone que debieron presentar una tendencia a la acumulación durante el desarrollo de la etapa experimental.

La determinación de sólidos suspendidos en sus tres modalidades (Tabla 13 y Fig. 7) denota un incremento en los sólidos suspendidos totales al séptimo día del período experimental. En este punto, la concentración de sólidos suspendidos volátiles es muy baja, con respecto a los sólidos suspendidos fijos. Este comportamiento puede ser explicado, si se considera que en ese punto es donde se registra mayor producción de biomasa y gran parte de las moléculas orgánicas en solución son sujetas de ser asimiladas por los microorganismos para la síntesis celular o de biomasa. Posteriormente, se registró un descenso significativo en la concentración de sólidos suspendidos totales y un ligero aumento en la concentración sólidos suspendidos volátiles, lo cual podría ser resultado del metabolismo endógeno, durante el que existe una resuspensión de material celular. Sin embargo, tal y como puede apreciarse en la tabla 13, no se registra un comportamiento homogéneo en los valores obtenidos, por lo que se puede inferir que este parámetro no fue el adecuado para la evaluación de una muestra con concentraciones tan bajas de materia orgánica e inorgánica. Asimismo, es importante destacar la presencia de sedimento o flóculos en el fondo de las botellas, al momento de sacarlas de la incubadora y dejarlas en reposo mientras se tomaban las muestras para realizar los análisis fisicoquímicos, ello debido a que la homogenización de la muestra pudo haber influido en la confiabilidad de los resultados obtenidos.

Por otra parte, la cuantificación de ortofosfatos, en la fracción disuelta de las muestras, (Tabla 13), permite apreciar que disminuye apreciablemente durante las tres primeras semanas de experimentación, volviéndose eventualmente un factor limitante. Este comportamiento es explicable debido a que el fósforo es indispensable para la síntesis de ATP y ácidos nucleicos (Metcalf y Eddy, 1991), de las bacterias presentes en el medio para lo cual biodegradan la materia orgánica disuelta. Sin embargo, al vigésimo octavo día se observó un incremento

importante de la concentración de ortofosfatos. Lo anterior es entendible, por lo menos de manera parcial, en el contexto de los ciclos biogeoquímicos; dado que cuando un organismo muere, las moléculas que contienen fósforo son liberadas por los descomponedores e incorporadas a su biomasa o bien, son mineralizadas. Cuando esto último ocurre, los fosfatos solubles son reincorporados a la cadena alimentaria como biomasa de nuevos organismos. Si ello no ocurre, durante la mineralización, el fósforo puede salir del sistema como fosfatos insolubles (Boyd, 1984). Considerando que se trabajó con un sistema cerrado a nivel laboratorio, los fosfatos liberados no tienen por dónde salir del sistema y/o no existen las condiciones fisicoquímicas o microbiológicas para la inmovilización del fosfato soluble a fósforo inorgánico, lo que repercute en el aumento de concentración antes citado. En el caso de los matraces con control del inóculo, dicho incremento se registró desde el vigésimo primer día de monitoreo, esto como resultado de la imposibilidad de síntesis apreciable de biomasa, pues no existían sustratos disponibles. Como consecuencia de lo expuesto anteriormente, se infiere la existencia de una fase de metabolismo endógeno y, posterior a la misma, la muerte de los microorganismos; lo que a su vez provocó que los fosfatos quedaran libres en solución a partir del día 21 de incubación.

Para finalizar con la discusión del comportamiento de los parámetros fisicoquímicos evaluados, la determinación de nitrógeno total, en la fracción disuelta de las muestras (Tabla 13), demostró un pequeño pero constante aumento de concentración durante los 28 días de etapa experimental. Este incremento pudo deberse a la degradación de compuestos nitrogenados presentes en el agua residual y/o a la liberación de compuestos nitrogenados de la biomasa microbiana, como resultado de la fase de metabolismo endógeno y lisis celular. Dado que el nitrógeno es un nutriente, los microorganismos responsables del proceso de biodegradación lo incorporan parcialmente a su biomasa, liberando una fracción en forma de amoníaco. Posteriormente, una porción de éste regresa al agua debido a la muerte y lisis de las células (Metcalf y Eddy, 1991). En ambientes acuáticos, la mayoría del nitrógeno se encuentra en forma de aminoácidos. Estos pueden ser incorporados directamente a la biomasa microbiana o pueden ser mineralizados con la liberación de iones amonio y formación de amoníaco en

solución. Las reacciones de mineralización dejan el nitrógeno disponible para que otros microorganismos lo usen y el nitrógeno amoniacal puede ser incorporado a biomoléculas o servir como fuente de energía para los microorganismos autótrofos (Boyd, 1984; Tórtora *et al.*, 1992). Sin embargo, pueden no existir las condiciones fisicoquímicas y/o microbiológicas, para continuar de manera adecuada el ciclo del nitrógeno en algún punto determinado, lo que podría dar como resultado final la acumulación de algún metabolito secundario.

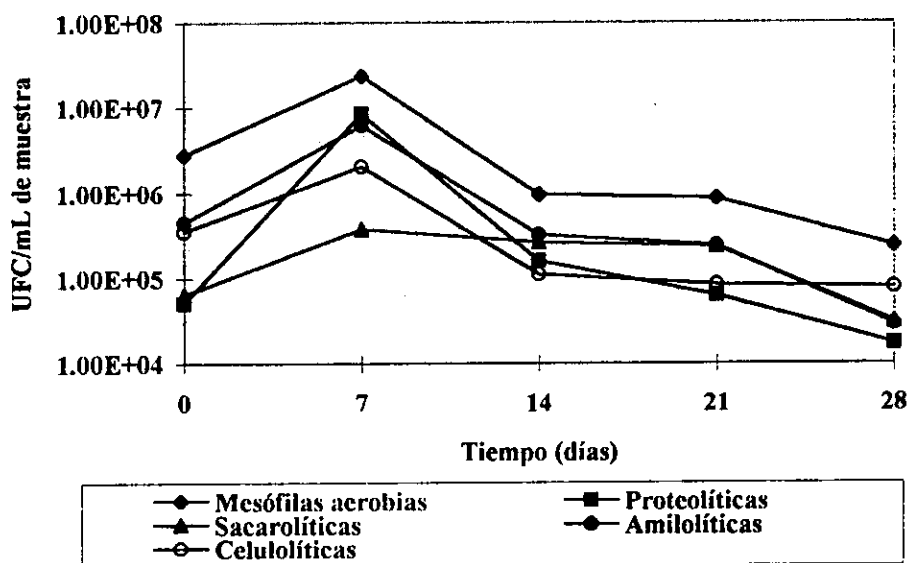
Con respecto al análisis bacteriológico efectuado, la cuenta en placa a 24 y 48 horas de incubación a 35°C mostró el aumento numérico de las bacterias mesófilas aerobias entre los días cero y séptimo (Tabla 14 y Fig. 8), período durante el cual se obtuvo un porcentaje de remoción total de 28.1% (equivalente al 41.5% del total de remoción de carbono orgánico disuelto logrado en los 28 días de monitoreo de la prueba). Las bacterias con actividad proteolítica, sacarolítica, amilolítica y celolítica se presentaron tróficamente activas durante todo el proceso de biodegradación estudiado. Esto se corrobora al analizar las curvas de crecimiento microbiano (Fig. 8), debido a que se observa el aumento de todos los grupos bacterianos durante el lapso de mayor remoción de materia orgánica disuelta, síntesis de biomasa y disminución de la concentración de oxígeno disuelto. La disminución cuantitativa de las mismas pudo ser consecuencia del agotamiento tanto de los sustratos disponibles como del oxígeno molecular disuelto, indispensable para un proceso de biodegradación aerobia.

Es importante destacar que no se observó el comportamiento típico de una curva de crecimiento microbiano. De acuerdo con la figura 8, no se detecta la fase lag o de adaptación; la fase log no es muy clara y no se observa una fase estacionaria. El punto de máximo crecimiento microbiano fue a los 7 días de etapa experimental y, posteriormente, la curva refleja la etapa de muerte o decaimiento. Es recomendable para apreciar de manera adecuada la evolución del crecimiento incluir tiempos de muestreo intermedios, principalmente en los primeros siete días de la prueba en los cuales el crecimiento microbiano es más rápido.

**Tabla 14. Cuenta total en placa y de grupos bacterianos tróficamente activos, después de 24 y 48 horas de incubación, de muestras procedentes de la aplicación de la prueba OECD 301-A no modificada**

Tiempo (días)	Mesófilas aerobias		Proteolíticas		Sacarolíticas		Amilolíticas		Celulíticas	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
	0	$4.15 \times 10^5$	$2.79 \times 10^6$	$2.90 \times 10^3$	$5.10 \times 10^4$	$7.5 \times 10^2$	$6.30 \times 10^4$	$9.3 \times 10^4$	$4.45 \times 10^5$	$2.45 \times 10^4$
7	$8.95 \times 10^6$	$2.36 \times 10^7$	$1.14 \times 10^4$	$8.50 \times 10^6$	$1.5 \times 10^3$	$3.75 \times 10^6$	$9.05 \times 10^5$	$6.15 \times 10^6$	$3.02 \times 10^5$	$2.04 \times 10^6$
14	$6.05 \times 10^6$	$9.60 \times 10^5$	$1.20 \times 10^4$	$1.60 \times 10^5$	$3.0 \times 10^2$	$2.63 \times 10^5$	$8.5 \times 10^3$	$3.23 \times 10^5$	$5.80 \times 10^4$	$1.10 \times 10^5$
21	$1.40 \times 10^5$	$8.60 \times 10^5$	$3.15 \times 10^3$	$6.20 \times 10^4$	$4.3 \times 10^4$	$2.38 \times 10^5$	$2.6 \times 10^3$	$2.40 \times 10^5$	$9.80 \times 10^3$	$8.40 \times 10^4$
28	$7.48 \times 10^4$	$2.40 \times 10^5$	$2.18 \times 10^3$	$1.70 \times 10^4$	$1.89 \times 10^3$	$2.49 \times 10^4$	$7.36 \times 10^2$	$2.85 \times 10^4$	$2.4 \times 10^2$	$7.80 \times 10^4$
Total	$1.56 \times 10^6$	$2.85 \times 10^7$	$3.16 \times 10^4$	$8.79 \times 10^6$	$4.74 \times 10^4$	$4.34 \times 10^6$	$1.01 \times 10^6$	$7.19 \times 10^6$	$3.94 \times 10^5$	$2.66 \times 10^6$

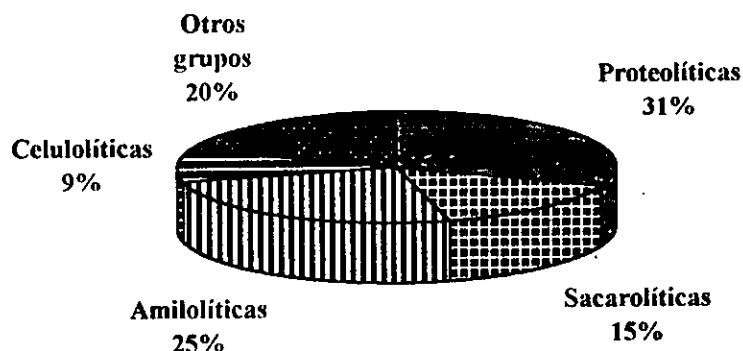
A 24 horas de incubación, se observa que no se han desarrollado el total de colonias sobre la superficie del medio, con respecto a las cuantificadas después de 48 horas de cultivo (Tabla 14) Por tal motivo los porcentajes que se mencionan posteriormente, corresponde al máximo de colonias bacterianas cuantificadas en ese tiempo.



**Figura 8. Perfiles de la cuenta total y de grupos bacterianos tróficamente activos después de 48 horas de incubación, para muestras sometidas a la prueba OECD 301-A no modificada**

Al analizar los resultados obtenidos de la cuenta en placa durante los 28 días de etapa experimental (Fig. 9), se observa que:

- Las bacterias mesófilas aerobias se desarrollaron considerablemente. Si se supone de manera arbitraria que representan al 100% de la población.
- Las bacterias con actividad proteolítica, representan el 30.8 % de la población total
- El 25.2 %, son bacterias con actividad amilolítica
- Las bacterias con actividad sacarolítica, constituyen un 15.2 % de la población
- El 9.3 %, corresponde a bacterias celulolíticas
- El 19.5% restante, no corresponde a ninguno de los grupos tróficos antes mencionados



**Figura 9. Porcentajes relativos de los grupos tróficos bacterianos después 48 horas de incubación, procedentes de muestras sometidas a la prueba OECD 301-A no modificada**

Las características de las colonias y la morfología microscópica de las bacterias desarrolladas en cada uno de los medios utilizados (Tabla 15) revelan el crecimiento de diferentes especies. La forma, textura y color desarrollados dependieron de la composición del medio de cultivo y de las condiciones de incubación empleadas.

Finalmente, como parte complementaria del análisis bacteriológico, se llevó a cabo la identificación de las colonias bacterianas descritas en la tabla 15. Por lo tanto, se utilizaron pruebas bioquímicas que ponen de manifiesto ciertas actividades metabólicas bacterianas. En el caso de las colonias Gram positivas, se detectó la presencia de bacilos esporulados Gram positivos; de manera que fueron catalogados como representantes del género *Bacillus*, debido a que se requiere un gran número de pruebas bioquímicas para poder identificar claramente la especie. Con respecto a las colonias Gram negativas, después de realizar las pruebas bioquímicas enumeradas en la tabla 16, así como de integrar otras observaciones realizadas como su lento crecimiento en agar Mac Conkey se concluyó que las colonias bacterianas tipificadas correspondían a *Acinetobacter calcoaceticus*. Como puede observarse, la prueba de reducción de nitritos permitió distinguir entre las dos variedades presentes *A. calcoaceticus* var *anitricans* y var *lwoffii*. En capítulos posteriores se hace una breve revisión de las características generales de estos microorganismos.

**Tabla 15. Características morfológicas macroscópicas y microscópicas de las colonias bacterianas presentes en muestras provenientes de la prueba OECD 301-A no modificada**

Colonias seleccionadas por su actividad:	Morfología macroscópica en el medio del que fueron aisladas	Morfología microscópica	Nombre
Mesófilas aerobias	Colonias pequeñas, beige, convexas, cremosas, brillantes, de borde entero y con tendencia a extenderse	Cocobacilos Gram -	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> var <i>anitricans</i> y var <i>lwoffii</i>
Mesófilas aerobias	Colonias beige, brillantes, butirosas, amiboides, ligeramente elevadas y de bordes enteros, con tendencia a extenderse	Bacilos Gram + esporulados	<i>Bacillus</i> spp
Proteolítica	Colonias pequeñas, beige, convexas, cremosas, brillantes, de borde ondulado y con tendencia a extenderse	Cocobacilos Gram -	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> var <i>lwoffii</i>
Amilolítica	Colonias amarillo claro, circulares, grandes, convexas, ligeramente rugosas, de bordes enteros, cremosas y con tendencia a extenderse	Bacilos Gram + esporulados	<i>Bacillus</i> spp
Sacarolítica	Colonias beige, pequeñas, de bordes irregulares, cremosas, convexas y brillantes	Cocobacilos Gram -	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> var <i>anitricans</i>
Sacarolítica	Colonias beige, grandes, extendidas, de borde entero, opacas, planas y cremosas	Bacilos Gram + esporulados	<i>Bacillus</i> spp

**Tabla 16. Resultados de las pruebas bioquímicas empleadas para la identificación de colonias Gram negativas presentes en muestras provenientes de la prueba OECD 301-A no modificada**

Colonias seleccionadas por su actividad	Utilización de citrato	TSI	Fenilalanina desaminasa	Lisina descarboxilasa	Ornitina descarboxilasa
Mesófilas aerobias	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Proteolítica	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Sacarolítica	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Colonias seleccionadas por su actividad	SIM	Leche tornasol	RM/VP	Reducción de nitratos
Mesófilas aerobias	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo Positivo
Proteolítica	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
Sacarolítica	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

En el siguiente inciso se presenta el análisis y discusión de resultados correspondiente a la prueba de biodegradabilidad aerobia rápida OECD 301-A modificada empleando el respirómetro automático VOITH-Sapromat B-12.

## 6.2. PRUEBA DE BIODEGRADABILIDAD AEROBIA OECD 301-A MODIFICADA

De acuerdo con los resultados obtenidos, el agua residual en estudio puede ser considerada como rápidamente biodegradable bajo los criterios de la prueba de biodegradabilidad aerobia rápida OECD 301-A (OECD, 1992) y las condiciones experimentales fijadas para este caso en particular, debido a que se alcanzó un 89.5% de remoción de materia orgánica (medida como carbono orgánico disuelto) en el transcurso de 28 días. Es importante señalar que desde el día 7, ya se había logrado un un 88.9% de remoción de carbono orgánico disuelto. Es decir, sobrepasó en tan sólo una cuarta parte del período experimental previsto el porcentaje de remoción establecido en la prueba por lo que puede considerarse como rápidamente biodegradable (Tabla 17).

**Tabla 17. Porcentaje de remoción de carbono orgánico disuelto (COD) en el agua residual sometida a la prueba OECD 301-A modificada**

Tiempo (días)	Porcentaje de remoción de COD (%)
7	88.9
14	89.2
21	89.5
28	89.5

Por otra parte, al evaluar el porcentaje de remoción de carbono orgánico disuelto alcanzado después de 28 días, en los cuatro matraces control empleados (Tabla 18), se constata el cumplimiento de las condiciones propuestas por la prueba OECD 301-A (Anexo A).

Uno de los criterios de validez requerido para la aceptación de la prueba, es que en el matraz de control de procedimiento debe alcanzarse al menos un 70% de remoción de carbono orgánico



disuelto en 14 días de acuerdo con la condición estipulada en este tipo de prueba (Anexo A). En la tabla 18 es posible apreciar que este criterio fue cumplido. De esta manera, se puede constatar que el desarrollo de la etapa experimental y la calidad del inóculo microbiano, eran adecuados para la realización de la prueba de biodegradabilidad aerobia rápida practicada. Sin embargo, también puede observarse que el matraz control de toxicidad registró un porcentaje de remoción de carbono orgánico disuelto de sólo 66.0%; lo que podría interpretarse como un efecto tóxico de la concentración de sustancia de prueba sobre la población microbiana. Estos resultados se discuten con mayor profundidad en el análisis comparativo entre los procedimientos evaluados.

**Tabla 18. Porcentaje de remoción de carbono orgánico disuelto (COD) alcanzado a los 28 días de etapa experimental, en los matraces control empleados durante la prueba OECD 301-A modificada**

Muestra	Porcentaje de remoción de COD (%)
Control de procedimiento	89.6 %
Control de toxicidad	66.0 %
Control de adsorción	36.0 %
Control de degradación abiótica	3.9 %

Por otra parte, la temperatura se mantuvo constante en 22°C, tal como lo marca la prueba OECD 301-A (OECD, 1992) debido a que las muestras se mantienen en un baño de agua controlado.

En la Tabla 19 y Fig. 16 puede observarse que el valor de pH inicial estaba en un valor cercano al neutro, con el fin de proporcionar un medio adecuado para los microorganismos y favorecer su adaptación durante la fase latente de crecimiento microbiano. Con lo anterior se pretende lograr el desarrollo de comunidades microbianas con actividad enzimática adecuada, que puedan degradar los sustratos disponibles. Cabe recordar que en el inciso correspondiente al análisis y discusión de la prueba OECD 301-A no modificada se puntualizó acerca de la importancia de los sistemas amortiguadores de pH.

**Tabla 19. Valores promedio de los parámetros fisicoquímicos evaluados a diferentes tiempos de muestreo obtenidos de la aplicación de la prueba OECD 301-A modificada**

Parámetro/ Muestra	pH unidades	O.D. (mg/L)	STT (mg/L)	STV (mg/L)	STF (mg/L)	SST (mg/L)	SSV (mg/L)	SSF (mg/L)	COD (mg/L)	DBO (mg/L)	NT (mg/L)	P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (mg/L)
Control de inóculo (ini)	7.20	6.6	915 ± 91	400 ± 113	515 ± 35	---	---	---	0.927 ± 0.064	---	0.0	110
Sustancia de prueba (ini)	7.17	6.6	980 ± 198	450 ± 212	530 ± 14	140 ± 71	65 ± 28	75 ± 48	14.929 ± 2.027	---	10.791 ± 1.294	148
Control de procedimiento (ini)	7.17	6.6	730 ± 127	70 ± 14	660 ± 141	---	---	---	14.073 ± 0.672	---	11.233 ± 1.64	---
Control de adsorción (ini)	7.15	6.4	720 ± 14	70 ± 14	650 ± 28	---	---	---	14.929 ± 2.027	---	10.912 ± 0.452	---
Control de toxicidad (ini)	7.11	6.4	810 ± 14	70 ± 14	740 ± 28	---	---	---	29.000 ± 0.805	---	10.794 ± 1.294	---
Control de degradación abiótica (ini)	7.24	6.8	780 ± 0	90 ± 14	690 ± 14	---	---	---	14.002 ± 0.207	---	10.791 ± 1.294	---
Sustancia de prueba (7 d)	7.52	6.2	1240 ± 71	640 ± 42	600 ± 71	250 ± 71	90 ± 28	160 ± 71	2.1797 ± 0.042	89	11.783 ± 0.092	52
Control de inóculo (7 d)	7.38	6.4	880 ± 42	330 ± 28	550 ± 28	---	---	---	0.619 ± 0.034	45	0.040 ± 0.011	20
Sustancia de prueba (14 d)	7.98	6.4	870 ± 42	280 ± 28	590 ± 14	80 ± 0	50 ± 14	30 ± 14	2.127 ± 0.348	79	12.762 ± 0.488	41
Control de inóculo (14 d)	7.85	6.2	810 ± 14	290 ± 0	520 ± 14	---	---	---	0.616 ± 0.034	47	0.059 ± 0.006	20

ini = inicial, d = días, O.D. = Oxígeno disuelto, STT = Sólidos totales, STV = Sólidos totales volátiles, STF = Sólidos totales fijos, SST = Sólidos suspendidos totales, SSV = Sólidos suspendidos volátiles, SSF = Sólidos suspendidos fijos, COD = Carbono orgánico disuelto, DBO = Demanda bioquímica de oxígeno a n días, NT = Nitrógeno total, P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> = Ortosfosfatos, --- No se realizó la determinación

Continuación Tabla 19. Valores promedio de los parámetros fisicoquímicos evaluados a diferentes tiempos de muestreo obtenidos de la aplicación de la prueba OECD 301-A modificada

Parámetro/ Muestra	pH unidades	O.D. (mg/L)	SST (mg/L)	STV (mg/L)	STF (mg/L)	SST (mg/L)	SSV (mg/L)	SSF (mg/L)	COD (mg/L)	DBO (mg/L)	NT (mg/L)	P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (mg/L)
Sustancia de prueba (21 d)	8.02	6.2	730 ± 71	80 ± 28	650 ± 42	120 ± 28	60 ± 0	60 ± 28	2.084 ± 0.196	95	13.821 ± 0.502	34
Control de inóculo (21 d)	7.73	6.8	780 ± 0	250 ± 14	530 ± 14	---	---	---	0.613 ± 0.146	148	0.063 ± 0.003	41
Sustancia de prueba (28 d)	8.41	6.2	670 ± 14	40 ± 0	630 ± 14	50 ± 14	20 ± 14	30 ± 0	2.067 ± 0.137	107	16.521 ± 1.216	71
Control de inóculo (28 d)	7.89	6.8	710 ± 14	60 ± 14	650 ± 42	---	---	---	0.598 ± 0.004	139	0.062 ± 0.001	56
Control de procedimiento (28 d)	8.34	6.2	870 ± 14	100 ± 0	770 ± 14	---	---	---	2.006 ± 0.127	99	11.321 ± 0.608	---
Control de adsorción (28 d)	8.21	5.4	680 ± 48	50 ± 14	630 ± 42	---	---	---	8.820 ± 1.180	0	10.963 ± 1.06	---
Control de toxicidad (28 d)	8.57	5.4	710 ± 48	60 ± 28	650 ± 42	---	---	---	10.157 ± 0.632	75	10.885 ± 1.31	---
Control de degradación abiótica (28 d)	7.50	5.6	800 ± 0	90 ± 14	710 ± 14	---	---	---	13.456 ± 1.253	0	11.036 ± 0.707	---

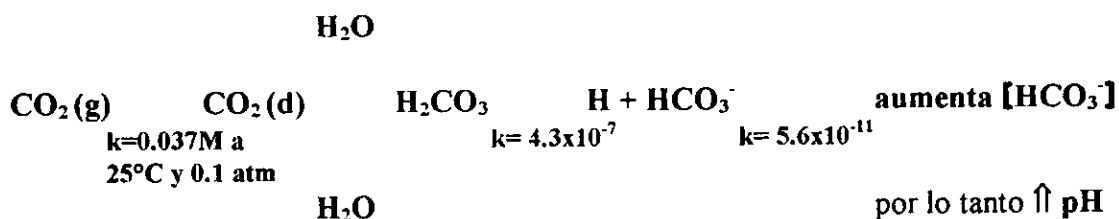
ini = inicial, d = días, O.D. = Oxígeno disuelto, SST = Sólidos totales, STT = Sólidos totales volátiles, STF = Sólidos totales fijos, SST = Sólidos suspendidos totales, SSV = Sólidos suspendidos volátiles, SSF = Sólidos suspendidos fijos, COD = Carbono orgánico disuelto, DBO = Demanda bioquímica de oxígeno a n días, NT = Nitrógeno total, P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> = Ortosfosfatos, --- No se realizó la determinación

Durante toda la etapa experimental los valores de pH tanto en los matraces con sustancia de prueba como en los matraces control del inóculo presentaron una tendencia hacia la alcalinización (Tabla 19 y Fig. 16). Una probable explicación a este comportamiento podría ser que el respirómetro VOITH-Sapromat B-12, funciona por medio de ligeros cambios de presión dentro del matraz que contiene la muestra; por lo tanto, la alcalinización del pH puede deberse a la saturación del carbonato de calcio utilizado como absorbente para captar el dióxido de carbono producido a partir de la respiración bacteriana; esta saturación se traduce en una caída de presión dentro de los matraces y por lo tanto, mayor suministro de oxígeno. En consecuencia, el dióxido de carbono presente sufre un incremento en su presión parcial dentro del sistema y, a efecto de mantener el equilibrio se disuelve mayor cantidad de dióxido de carbono en el medio acuoso para dar lugar a la formación de ácido carbónico. Al aumentar la concentración de dióxido de carbono disuelto, aumenta la disociación de ácido carbónico en bicarbonato y iones hidrógeno. Llega un momento en que, la capacidad amortiguadora de los fosfatos, así como del par iónico bicarbonato/ácido carbónico que forma parte de otro sistema amortiguador eficiente a valores de pH cercanos a 7.4, es rebasada (Lehninger *et al.*, 1993), por lo que la concentración de iones bicarbonato en solución aumenta y el pH del medio se basifica.

Asimismo, es oportuno señalar que existen iones bicarbonato en la muestra inicial, ya que este compuesto es empleado para la estabilización del reactor anaerobio de donde se obtuvo la muestra para la realización de esta etapa experimental. Con respecto al comportamiento de los matraces control, el pH después de 28 días de etapa experimental, también presentó tendencia hacia la alcalinización, (inclusive el matraz control de degradación abiótica), hecho que refuerza la explicación de este fenómeno basada en la producción de dióxido de carbono que culmina con el desplazamiento del sistema amortiguador bicarbonato/ácido carbónico. Este parámetro fisicoquímico es determinante tanto para la biodegradabilidad de una sustancia, como para el crecimiento microbiano. A continuación se presenta un diagrama que esquematiza la explicación dada para el comportamiento del pH (Fig. 10).

Fase gaseosa  
(espacio libre)

Fase acuosa (solución contenida en el matraz)



**Figura 10. Representación esquemática del comportamiento del pH con respecto al sistema amortiguador bicarbonato/ácido carbónico durante la aplicación de la prueba OECD 301-A modificada**

La dilución de agua residual denominada como sustancia de prueba, así como todos los controles preparados (Tabla 19) tenían al inicio del experimento concentraciones de oxígeno disuelto apropiadas para permitir la biodegradación en condiciones aerobias. La concentración de oxígeno disuelto presente en las muestras con sustancia de prueba y control del inóculo se mantuvo por encima de 6.0 mgO<sub>2</sub>/L durante toda la etapa experimental (Tabla 19 y Fig. 15). Lo anterior fue factible debido a que el respirómetro VOITH-Sapromat B-12, suministra oxígeno de manera continua y acorde con el requerimiento de cada muestra, por lo que al iniciar y al finalizar el proceso de biodegradación, todos los sustratos biodegradables lo hicieron bajo condiciones aerobias. Sin embargo, es oportuno recordar que el carbonato de calcio contenido dentro del matraz de reacción se sacó mojado desde el primer punto de muestreo (7 días); lo que permite explicar el registro de consumo de oxígeno en los matraces de control de adsorción y control de degradación abiótica. Dicho consumo no debió de haber ocurrido, dado que fueron esterilizados por adición de cloruro de mercurio e incluso, el matraz control de degradación abiótica no incluyó inóculo en su composición. Sin embargo, se pudieron ajustar los valores de consumo de oxígeno obtenidos en este experimento, mediante la resta de los valores de consumo de oxígeno registrados en el matraz control de la etapa experimental previa

(Capítulo 4 y Anexo C, Tabla 24). De esta manera se obtuvo el consumo de oxígeno absoluto a lo largo del período de biodegradación estudiado.

Adicionalmente, con relación al consumo de oxígeno, se observó que durante el tercer y cuarto tiempos de muestreo (21 y 28 días), los matraces con control de inóculo consumieron más oxígeno que los matraces con sustancia de prueba (Anexo C, Tabla 25). Al respecto, puede considerarse que el 89.5% de remoción de carbono orgánico disuelto, alcanzado después de 28 días de etapa experimental, es el valor máximo de biodegradabilidad que puede obtenerse para este tipo de agua residual y que por ello, no se registró consumo extra de oxígeno después de los primeros 21 días de etapa experimental.

Al procesar los datos presentados en la tabla 20, se obtiene la siguiente información:

Velocidad de consumo oxígeno días 1-16: 5.47 mg O<sub>2</sub>/L día

Datos de regresión lineal: A= 24.1, B= 5.47, r= 0.9315, r<sup>2</sup>= 0.8676

donde: A= ordenada al origen, B = pendiente de la recta y r = coeficiente de regresión lineal

Es importante destacar que, en este caso, sí se registró una dispersión considerable de los valores de consumo de oxígeno, lo cual se refleja en los valores de la desviación estándar de los mismos. Como puede apreciarse, éstas estuvieron por encima del 10%, lo que es un valor alto. Esto puede hallar una explicación si se destaca que, de acuerdo con la tabla 25 incluida en el Anexo C de este trabajo, se observó que hubo un matraz con sustancia de prueba que consumió menos cantidad de oxígeno con respecto a los demás matraces con composición similar. Adicionalmente, los valores de la desviación estándar fueron calculados con sólo n= 4 datos; el valor de n disminuyó a lo largo del período experimental. De acuerdo con lo expuesto anteriormente, es recomendable realizar más ensayos con concentraciones de materia orgánica similares a efecto de conocer con exactitud la confiabilidad de los datos de consumo de oxígeno a partir de concentraciones muy bajas.

**Tabla 20. Relación de valores de consumo de oxígeno promedio acumulado (mg/L) y tasa de consumo de oxígeno (TCO) por día de muestras sometidas a la prueba OECD 301-A modificada**

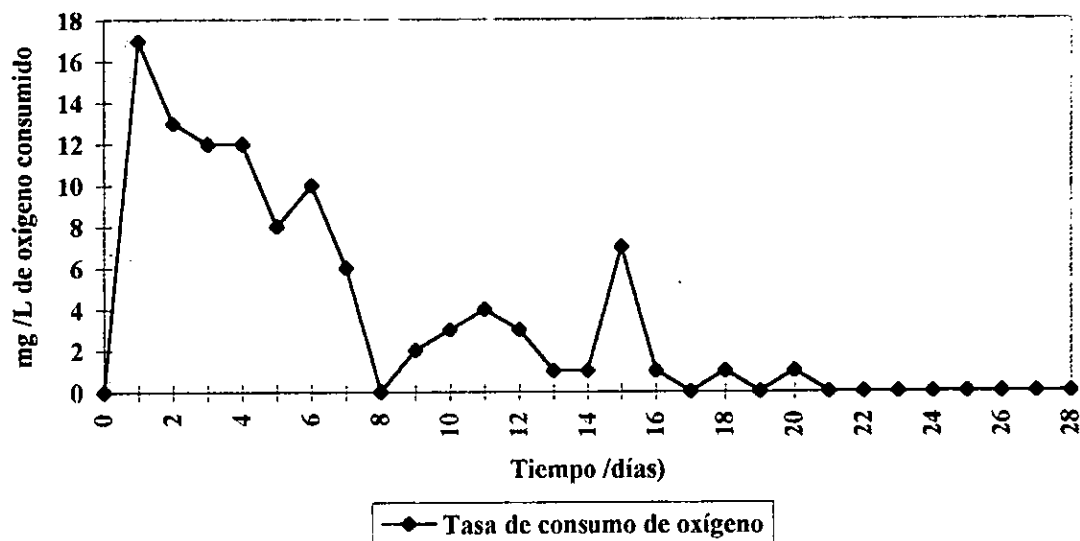
Tiempo (días)	CO promedio (mg/L)	TCO (mg/L d)	Tiempo (días)	CO promedio (mg/L)	TCO (mg/L d)
0	0	0	11	87 ± 14	4
1	17 ± 3	17	12	90 ± 11	3
2	30 ± 6	13	13	91 ± 11	1
3	42 ± 9	12	14	92 ± 12	1
4	54 ± 4	12	15	99 ± 6	7
5	62 ± 6	8	16	100 ± 6	1
6	72 ± 9	10	17	100 ± 6	0
7	78 ± 12	6	18	101 ± 6	1
8	78 ± 16	0	19	101 ± 6	0
9	80 ± 18	2	20	102 ± 8	1
10	83 ± 17	3	21	102 ± 8	0

**Nota 1:** Debido a que se retiró un matraz en cada tiempo de muestreo preestablecido para el análisis de parámetros fisicoquímicos y microbiológicos, el valor de n para calcular el consumo de oxígeno (CO) promedio, así como su desviación estándar, disminuye conforme transcurre el tiempo de evaluación

**Nota 2:** La tabla comprende valores hasta el día 21 de etapa experimental, debido a que a partir de este punto es donde ya no se registra consumo de oxígeno de acuerdo con los valores ajustados con el consumo de oxígeno del agua destilada

El comportamiento de la tasa de consumo de oxígeno (TCO) promedio por día se muestra en la tabla 20 y figura 11. Como se puede observar, durante los cuatro primeros días de incubación se registraron los valores de TCO más altos, este consumo puede relacionarse con la existencia de un mayor número de bacterias heterótrofas, las cuales requieren a su vez consumir más oxígeno para realizar la degradación de la materia orgánica disuelta de tipo carbonoso. Debe recordarse que el porcentaje de remoción de carbono orgánico disuelto al séptimo día de etapa experimental fue de 88.9% y que, posteriormente este valor casi no sufrió incremento. A partir del séptimo día y hasta el día 21 hubo muy poco consumo de oxígeno. Finalmente, a partir de este punto ya no se registró consumo de oxígeno de acuerdo con los datos ajustados mediante la resta de los valores de consumo de oxígeno de una muestra con únicamente agua destilada. En la figura 11 no se observa un comportamiento homogéneo de la tasa de consumo de

oxígeno promedio; esto pudo deberse a que sólo se dispuso de 4 matraces con sustancia para realizar este cálculo.

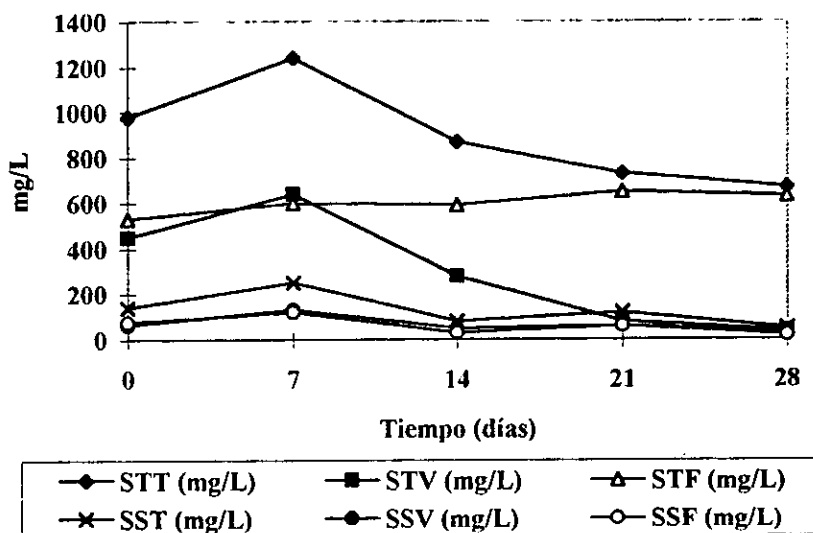


**Figura 11. Perfil de comportamiento de la tasa de consumo de oxígeno promedio (TCO) por día de las muestras sometidas a la prueba OECD 301-A modificada**

Pasando a otro aspecto, la determinación de sólidos totales, en sus tres modalidades (Tabla 19 y Fig. 12) permitió detectar la conversión de materia orgánica a biomasa, en relación con el aumento de los sólidos totales volátiles al evaluar este parámetro en el primer tiempo de muestreo (séptimo día de arranque de la prueba). A partir del décimocuarto día y hasta concluir la etapa experimental, la concentración de sólidos totales disminuyó paulatinamente. Al analizar los resultados, se observa que la concentración de sólidos totales volátiles es la que disminuye considerablemente, mientras que la concentración de sólidos totales fijos se mantuvo relativamente constante. Estos resultados hacen suponer que una proporción de materia orgánica disuelta fue completamente mineralizada hasta dióxido de carbono no cuantificado. En párrafos anteriores ya se discutió acerca del papel del dióxido de carbono en el comportamiento del pH, así como del efecto que éste ejerce sobre los valores de consumo de oxígeno registrados por el respirómetro automático, cuando la mayor parte de la materia orgánica disuelta ha sido biodegradada por los microorganismos presentes.



De igual manera, en el inciso dedicado al análisis y discusión de la prueba de biodegradabilidad aerobia rápida OECD 301-A no modificada, se abundó sobre la fase de metabolismo endógeno y su posible influencia sobre los resultados obtenidos a partir del seguimiento de las diferentes modalidades de sólidos.



**Figura 12. Perfil de comportamiento de los sólidos totales y suspendidos presentes en las muestras sometidas a la prueba OECD 301-A modificada**

En el caso de los matraces control de inóculo (Tabla 19), la evaluación de sólidos totales permitió observar el descenso de las concentraciones de éstos en sus tres modalidades, debido probablemente, al metabolismo endógeno y posterior lisis celular. El comportamiento de los sólidos de los matraces control empleados sólo fue evaluado al inicio y al final de la pruebas; ello debido a que no es aconsejable retirar matraces y volverlos a conectar al respirómetro. De cualquier manera, al analizar los valores disponibles es posible apreciar que se registró una tendencia similar a la observada en los matraces con sustancia de prueba, es decir, los diferentes tipos de sólidos evaluados disminuyeron.

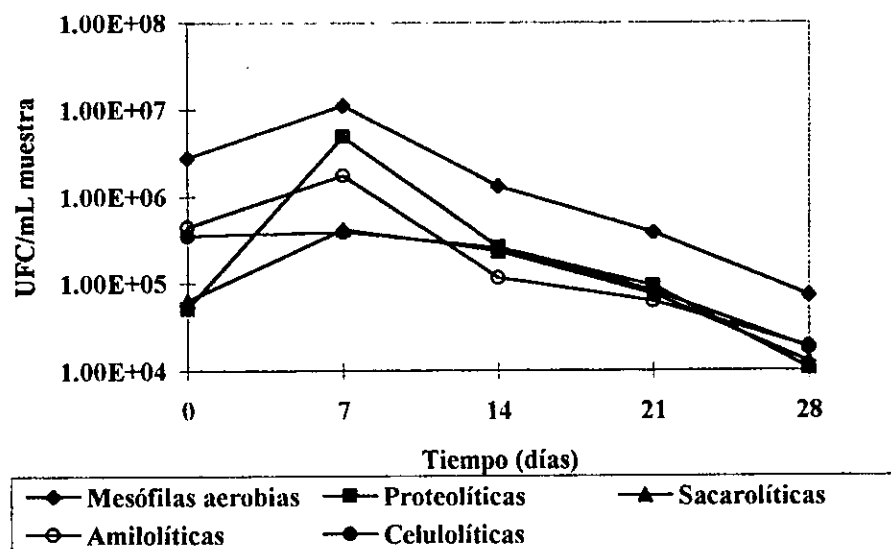
La determinación de sólidos suspendidos en sus tres modalidades (Tabla 19 y Fig. 12) presentó la misma tendencia de incremento de valores al séptimo día del período experimental. Posteriormente, se registró un descenso significativo en la concentración de sólidos suspendidos totales y sólidos suspendidos volátiles, sin embargo, tal y como puede apreciarse en la tabla 19, no se registra el comportamiento esperado en la concentración de sólidos suspendidos, por lo que se puede inferir que este parámetro no resulta adecuado para la evaluación de una muestra con concentraciones tan bajas de materia orgánica e inorgánica. Al igual que en el caso de la prueba OECD 301-A no modificada; se observó la presencia de flóculos blanquecinos después de retirar los matraces del respirómetro, al momento de intentar tomar las muestras para la determinación de parámetros fisicoquímicos. Por ello es posible pensar, que probablemente la homogeneidad de la muestra no fue la adecuada, para la valoración de sólidos suspendidos

Para finalizar con la discusión del comportamiento los parámetros fisicoquímicos evaluados, se discute con respecto al comportamiento de los ortofosfatos y nitrógeno total en la fracción disuelta de las muestras (Tabla 19). Como se puede apreciar, estos dos parámetros presentaron una tendencia similar a la observada en las muestras procedentes de la aplicación de la prueba OECD 301-A no modificada. En su oportunidad, ya se profundizó en la discusión de los resultados y ésta sería similar para los resultados obtenidos con las muestras sometidas a la prueba OECD 301-A modificada empleando un respirómetro automático.

Pasando a los aspectos microbiológicos, el comportamiento en el desarrollo de los diferentes grupos tróficos bacterianos a 24 y 48 horas de cultivo a 35°C (Tabla 21). En ella observa que a las 24 horas de incubación, son menos las bacterias que se han desarrollado sobre la superficie del medio, mientras que a 48 horas de incubación, existe un aumento significativo en la cantidad de colonias bacterianas desarrolladas. A continuación se presentan las curvas de crecimiento microbiano obtenidas de la cuenta en placa después de 48 horas de incubación (Fig. 13), durante el proceso de biodegradación de 28 días.

Tabla 21. Cuenta total en placa y de grupos bacterianos tróficamente activos después de 24 y 48 horas de incubación, de muestras procedentes de la aplicación de la prueba OECD 301-A modificada

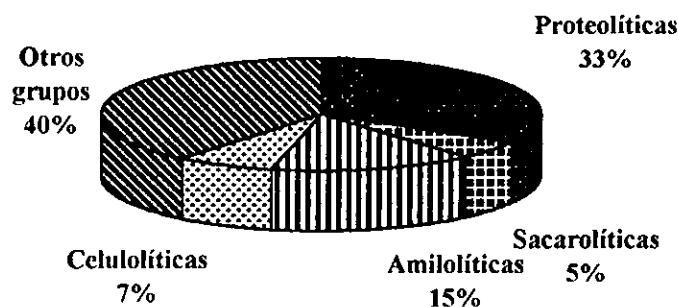
Tiempo (días)	Mesófitas aerobias		Proteolíticas		Sacarolíticas		Amilolíticas		Celulolíticas	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
0	$4.15 \times 10^5$	$2.79 \times 10^6$	$2.90 \times 10^3$	$5.10 \times 10^4$	$7.50 \times 10^2$	$6.30 \times 10^4$	$9.30 \times 10^4$	$4.45 \times 10^3$	$2.45 \times 10^4$	$3.50 \times 10^5$
7	$9.20 \times 10^5$	$1.11 \times 10^7$	$2.80 \times 10^4$	$4.80 \times 10^6$	$1.20 \times 10^3$	$4.10 \times 10^5$	$7.50 \times 10^5$	$1.73 \times 10^6$	$6.00 \times 10^3$	$3.88 \times 10^5$
14	$1.49 \times 10^5$	$1.29 \times 10^6$	$3.80 \times 10^4$	$2.60 \times 10^5$	$1.20 \times 10^3$	$2.32 \times 10^5$	$1.65 \times 10^3$	$1.15 \times 10^5$	$1.25 \times 10^4$	$2.55 \times 10^5$
21	$8.10 \times 10^4$	$3.80 \times 10^5$	$9.30 \times 10^3$	$9.30 \times 10^4$	$6.40 \times 10^3$	$7.45 \times 10^4$	$5.90 \times 10^2$	$6.20 \times 10^4$	$9.80 \times 10^3$	$8.10 \times 10^4$
28	$3.50 \times 10^4$	$7.15 \times 10^4$	$2.30 \times 10^3$	$1.05 \times 10^4$	$7.60 \times 10^3$	$1.25 \times 10^4$	$5.40 \times 10^3$	$1.85 \times 10^4$	$6.80 \times 10^3$	$1.79 \times 10^4$
Total	$1.64 \times 10^6$	$1.56 \times 10^7$	$2.11 \times 10^4$	$5.21 \times 10^6$	$1.72 \times 10^4$	$7.92 \times 10^5$	$8.51 \times 10^5$	$2.37 \times 10^6$	$5.96 \times 10^4$	$1.09 \times 10^6$



**Figura 13. Perfiles de la cuenta total y de grupos bacterianos tróficamente activos después de 48 horas de incubación para muestras sometidas a la prueba OECD 301-A modificada**

Retomando el punto anterior, las bacterias proteolíticas, sacarolíticas, amilolíticas y celulolíticas se presentaron tróficamente activas durante todo el proceso de biodegradación monitoreado, ya que su cantidad se incrementó al inicio del experimento y continuaron detectándose hasta el último tiempo de muestreo (Tabla 21 y Fig. 13). La cuenta en placa de los grupos bacterianos tróficamente activos mostró el aumento en la abundancia de bacterias mesófilas aerobias entre los días cero y séptimo. Cabe recordar que durante este lapso se obtuvo un porcentaje de remoción total de carbono orgánico disuelto de 88.9% (equivalente al 99.3% de remoción de carbono orgánico disuelto alcanzado después de transcurrir 28 días de etapa experimental). Asimismo, esta etapa se caracteriza por registrar los valores más alto de consumo de oxígeno en todos los matraces. La disminución cuantitativa en la abundancia bacteriana, se presenta como resultado del agotamiento de los sustratos disponibles, al mismo tiempo que el porcentaje de remoción de materia orgánica disuelta permanece prácticamente constante y se registra muy poco consumo de oxígeno.

Analizando los resultados obtenidos de la cuenta de bacterias y suponiendo arbitrariamente que las mesófilas aerobias constituyen el 100% de la población, se observa que el 33.4% son bacterias con actividad proteolítica; el 15.2% corresponde a bacterias con actividad amilolítica; el 5.1% está constituido por bacterias con actividad sacarolítica y el 7.0% corresponde a bacterias que pueden degradar el polisacárido celulosa. Lo anterior puede verse gráficamente en la figura 14.



**Figura 14. Porcentajes relativos de los grupos tróficos bacterianos después de 48 horas de incubación, procedentes de la prueba OECD 301-A modificada**

De igual manera, es importante hacer notar que en este caso tampoco fue posible observar en la figura 13, el comportamiento clásico de una curva de crecimiento microbiano. Como se señaló en su oportunidad, se recomienda incluir tiempos de muestreo intermedios para apreciar dicho comportamiento de manera más exacta.

Las características coloniales y la morfología microscópica de las bacterias desarrolladas en cada uno de los medios utilizados (Tabla 22) revelan el crecimiento de diferentes especies. Su forma, textura y color son característicos; están en función de la composición del medio de cultivo y de las condiciones de incubación empleadas.

**Tabla 22. Características morfológicas macroscópicas y microscópicas de las colonias desarrolladas obtenidos mediante la aplicación de la prueba OECD 301-A modificada**

Colonias seleccionadas por su actividad:	Morfología macroscópica en el medio del que fueron aisladas	Morfología microscópica	Nombre
Mesófilas aerobias	Colonias beige, brillantes, butirosas, amiboides, ligeramente elevadas y de bordes enteros, con tendencia a extenderse	Cocobacilos Gram -	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> var <i>anitricans</i> y var <i>lwoffii</i>
Mesófilas aerobias	Colonias planas, rizoides, opacas, secas, membranosas, extendidas, de borde crenado e irregular, color beige	Bacilos Gram + esporulados	<i>Bacillus</i> spp
Proteolítica	Colonias pequeñas, beige, convexas, cremosas, brillantes, de borde ondulado y con tendencia a extenderse	Cocobacilos Gram -	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> var <i>lwoffii</i>
Amilolítica	Colonias amarillo claro, circulares, grandes, convexas, lisas, de bordes enteros, cremosas y con tendencia a extenderse	Bacilos Gram + esporulados	<i>Bacillus</i> spp
Sacarolítica	Colonias beige, pequeñas, de bordes irregulares, cremosas, convexas y brillantes	Cocobacilos Gram -	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> var <i>anitricans</i> y var <i>lwoffii</i>
Sacarolítica	Colonias beige, extendidas, de borde entero, opacas, planas y cremosas	Bacilos Gram + esporulados	<i>Bacillus</i> spp

Entre las especies de bacterias identificada mediante la observación de características macroscópicas, morfología microscópica y pruebas bioquímicas (Tablas 22 y 23) se encontraron *Bacillus* spp y *Acinetobacter calcoaceticus* var *anitricans* y var *lwoffii*. En el caso de las colonias Gram positivas la identificación fue realizada únicamente hasta género, ya que se requiere un gran número de pruebas bioquímicas para poder identificar la especie. En el caso de las colonias Gram negativas, la prueba de reducción de nitratos fue la que permitió distinguir las variedades de *Acinetobacter calcoaceticus* presentes. En el siguiente inciso se discutirá de manera más amplia, la presencia de estas especies bacterianas en aguas residuales.

**Tabla 23. Resultados de las pruebas bioquímicas empleadas para la identificación de colonias Gram negativas presentes en las muestras sometidas a la prueba OECD 301-A modificada**

Colonias seleccionadas por su actividad	Utilización de citrato	TSI	Fenilalanina desaminasa	Ornitina descarboxilasa	Lisina descarboxilasa
Mesófilas aerobias	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Proteolítica	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Sacarolítica	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

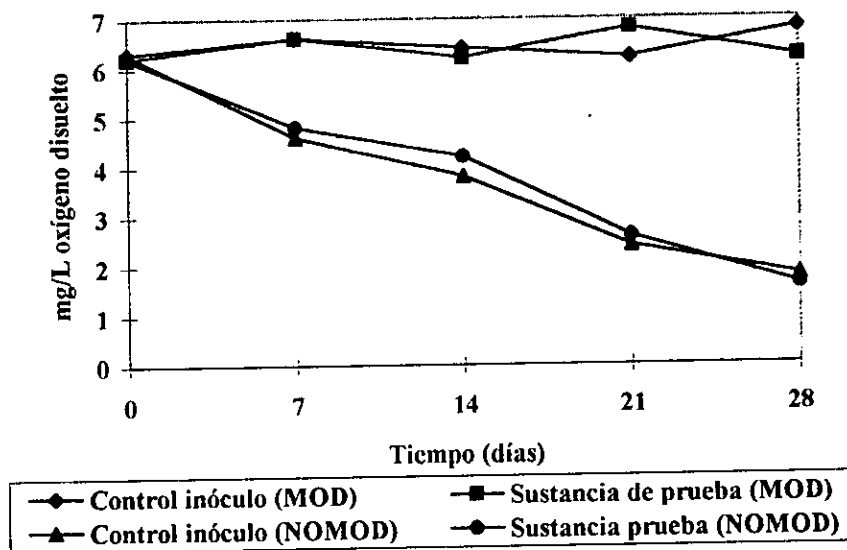
Colonias seleccionadas por su actividad	Leche tornasol	SIM	RM/VP	Reducción de nitratos	
Mesófilas aerobias	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
Proteolítica	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	
Sacarolítica	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo

A continuación, se procederá al análisis comparativo de los resultados obtenidos de la aplicación de la prueba de biodegradabilidad aerobia rápida no modificada y modificada.

### 6.3. ANÁLISIS COMPARATIVO DE AMBOS PROCEDIMIENTOS

De acuerdo con el análisis de resultados expuesto anteriormente, es posible resaltar la importancia del suministro continuo de oxígeno y acorde con el requerimiento de cada muestra; para que el todo el proceso de biodegradación (28 días) se realice bajo condiciones aerobias, tal y como sucedió en las muestras sometidas a la prueba OECD 301-A modificada empleando el respirómetro automático. El suministro de oxígeno incide directamente en la concentración de oxígeno disuelto presente en el medio acuoso (Fig. 15), por lo que en el caso de la prueba OECD 301-A modificada, la concentración de oxígeno disuelto permaneció por arriba de 6.0 mgO<sub>2</sub>/L en todas las muestras (Tabla 19). En el caso de la prueba de biodegradabilidad aerobia rápida OECD 301-A no modificada, la concentración de oxígeno fue disminuyendo paulatinamente a lo largo del periodo de biodegradación monitoreado (Tabla 13).

Este fenómeno es consecuencia de la actividad respiratoria de los microorganismos, que oxidan los sustratos disponibles y consumen el oxígeno disuelto en el medio acuoso. Sin embargo; como no existió un aporte adicional de éste después del inicio del experimento, la concentración de oxígeno disuelto después de 28 días llegó a estar inclusive por debajo de 2 mgO<sub>2</sub>/L, que es el límite establecido para considerar condiciones aerobias.

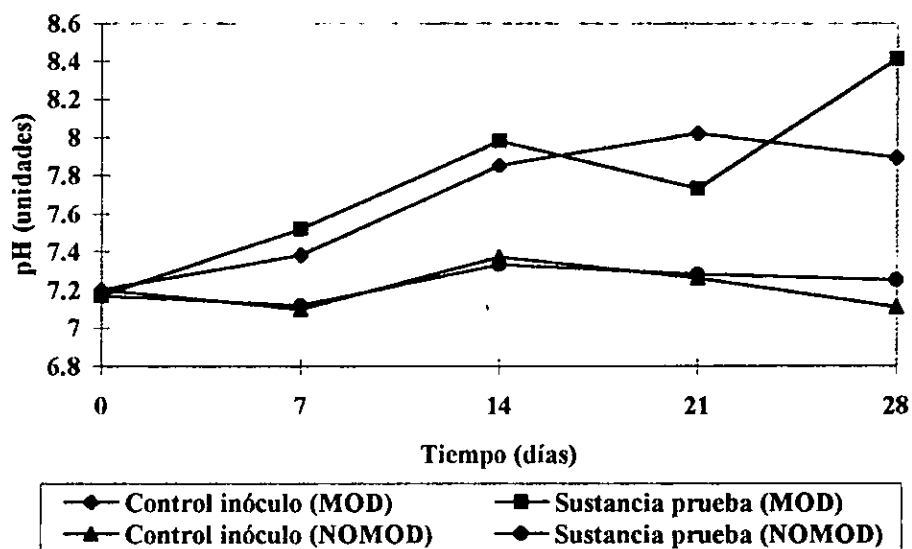


**Figura 15. Análisis comparativo de la concentración de oxígeno disuelto en las muestras sometidas a la prueba OECD 301-A no modificada (NOMOD) y modificada (MOD)**

El comportamiento del pH durante los 28 días de duración de la prueba de biodegradabilidad aerobia rápida puede observarse en la figura 16. La alcalinización del pH ocurrida en la prueba OECD 301-A modificada (Tabla 19), pudo deberse a la incorporación de dióxido de carbono (no absorbido en el carbonato de calcio) a la solución acuosa, por lo que al quedar libre provocó el desplazamiento del sistema amortiguador bicarbonato-ácido carbónico, hacia la formación de iones bicarbonato en solución. En el caso de la prueba OECD 301-A no modificada (Tabla 13), el pH se mantuvo relativamente constante quizá debido a que la producción dióxido de carbono fue menor, como reflejo de una menor velocidad de oxidación de los sustratos en comparación con la que fue observada en la prueba modificada. En

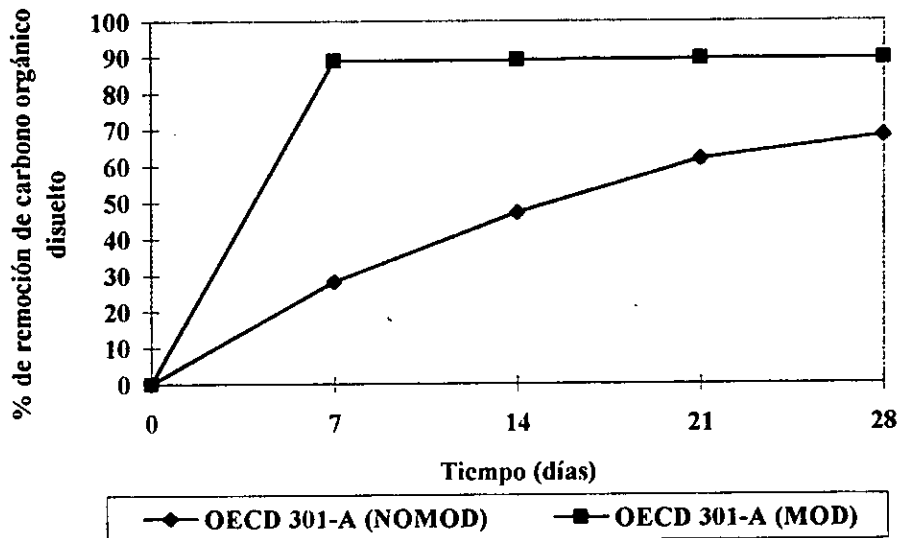


consecuencia, como efecto final, se tiene que la capacidad del sistema amortiguador no fue rebasada.



**Figura 16. Perfil de los valores de pH para muestras sometidas a la prueba OECD 301-A no modificada (NOMOD) y modificada (MOD)**

De acuerdo con los resultados obtenidos de la aplicación de la prueba OECD 301-A no modificada, el agua residual bajo estudio no puede ser considerada como rápidamente biodegradable, mientras que con el procedimiento modificado utilizando el respirómetro automático, sí puede ser considerada como tal (Tablas 11 y 17). Como puede observarse en la figura 17, la velocidad de remoción de materia orgánica disuelta fue mayor en la prueba modificada que en la no modificada. Debido a que las pruebas se corrieron en paralelo, al igual que las muestras fueron preparadas de manera similar y utilizando el mismo inóculo microbiano, puede afirmarse que la presencia y disponibilidad de oxígeno disuelto; influyó en los porcentajes de remoción de carbono orgánico disuelto y, en general, en el tipo de resultados obtenidos. Por otra parte, el porcentaje de remoción de carbono orgánico disuelto en los matraces control de procedimiento (Tablas 12 y 18) fue aceptable por lo que pueden considerarse como válidas ambas pruebas realizadas (89.6% en la prueba modificada y 81.9% en la prueba no modificada).



**Figura 17. Comparación de los porcentajes de remoción de carbono orgánico disuelto logrados en las pruebas de biodegradabilidad aerobia rápida realizadas**

Los matraces control de toxicidad, registraron menor porcentaje de de remoción de carbono orgánico disuelto con respecto a los matraces con control de procedimiento (66.0 y 79.3% en las pruebas modificada y no modificada respectivamente). De acuerdo con las normas consultadas, si el porcentaje de degradación en el control de toxicidad es menor que el obtenido en el matraz control de procedimiento, es posible interpretar este resultado como una indicación de que la concentración de la sustancia de prueba ensayada fue tóxica para los microorganismos o tiene la capacidad de suprimir la actividad microbiana. Para confirmar esta sospecha, se recomienda repetir el ensayo con una menor concentración de la sustancia de prueba. Cabe recordar que en este caso, se utilizó una concentración muy baja de sustancia de prueba (14 mgCOD/L) y que el factor de dilución fue muy alto, ya que se partió de un agua residual concentrada (aproximadamente 17,000 mgDQO/L). Este hecho podría traducirse por un lado, en que la muestra sin dilución es tóxica o inhibitoria para el desarrollo de microorganismos; por otra parte, evaluar una menor concentración implicaría diluir aún más, con el consecuente incremento en la incertidumbre de los resultados obtenidos. Finalmente,

otro factor que hay que considerar en la interpretación de estos resultados, es la posibilidad de que durante el proceso de biodegradación se formen metabolitos secundarios, que por sí mismos ejerzan un efecto tóxico o inhibitorio sobre la población microbiana. Por lo tanto, sería conveniente realizar estudios de biodegradabilidad similares, donde se incluyan ensayos de toxicidad para abundar al respecto y confirmar las hipótesis planteadas para la discusión y justificación de los resultados obtenidos.

Por otra parte, el comportamiento de los sólidos totales fue similar en ambos procedimientos. En primer término, se presentaron incrementos en la concentración de sólidos totales y sólidos totales volátiles, al séptimo día de monitoreo y es precisamente en este punto donde se registra un mayor porcentaje de remoción de carbono orgánico disuelto, así como una mayor concentración de biomasa y de consumo de oxígeno. Posteriormente, a partir de los 14 días de duración del experimento, se registró una disminución paulatina en la concentración de sólidos totales y sólidos totales volátiles. Esta tendencia probablemente es consecuencia de la menor cantidad de sustratos oxidables disponibles. Además, es factible suponer que las bacterias entraron en metabolismo endógeno; por lo que la concentración de sólidos totales disminuye, por un efecto combinado entre la lisis de bacterias, como por la mayor producción de dióxido de carbono que queda libre en solución. Esta idea se ve apoyada al constatar que, la concentración de sólidos totales fijos permanece relativamente constante a través del experimento (Figs. 7 y 12).

El comportamiento de los sólidos suspendidos en ambos procedimientos puede explicarse mediante la formación de flóculos microbianos de fácil sedimentación, los cuales son resultado de la biotransformación de la materia orgánica disuelta presente en la muestra (Figs. 7 y 12). La concentración de sólidos suspendidos disminuyó paulatinamente, y pudieron observarse como sólidos blanquecinos en el fondo de las botellas Winkler o matraces al dejarlos en reposo.

Por otro lado, la concentración de nitrógeno total en solución para ambos procedimientos (Tablas 13 y 19), se incrementó ligeramente a lo largo de los 28 días de duración de la prueba.

Este comportamiento puede deberse a la producción de amoníaco y metabolitos secundarios provenientes de los microorganismos o de su lisis celular.

Finalmente, en ambos procedimientos, la concentración de ortofosfatos disminuyó durante las tres primeras semanas de prueba (Tablas 13 y 19), lo cual puede explicarse en función de la síntesis de ATP y acumulación de gránulos de polifosfato (Metcalf y Eddy, 1991), útiles en los procesos metabólicos celulares. Por otra parte en el último punto de monitoreo, la concentración de ortofosfatos registrada aumentó considerablemente; lo que pudiera deberse a la liberación de fosfatos provenientes del metabolismo endógeno y de la lisis celular. Cabe señalar que dentro de los matraces de prueba, no se encuentran las condiciones fisicoquímicas y/o microbiológicas requeridas para la inmovilización del fosfato soluble a fosfatos inorgánicos.

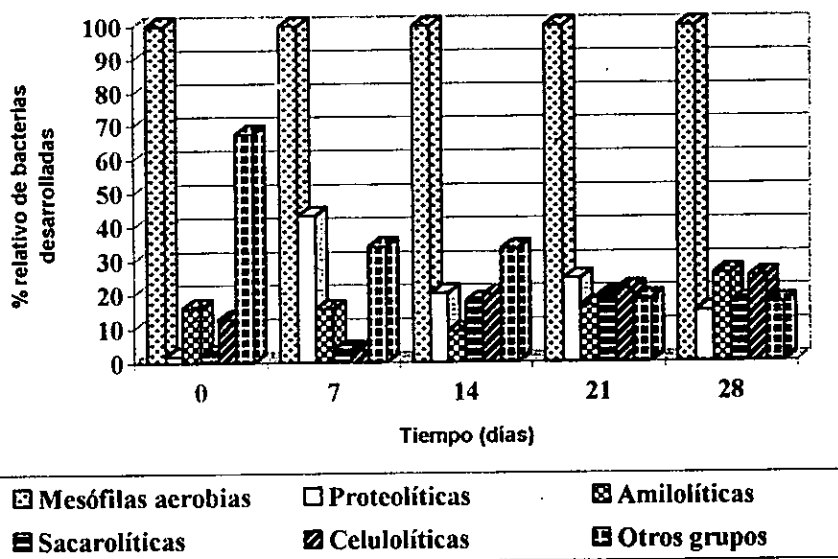
Con respecto a los resultados de parámetros microbiológicos, la cuenta total y de todos los grupos bacterianos tróficamente activos, tuvieron su máxima abundancia en el primer punto de monitoreo, es decir a los 7 días. Es precisamente en este punto donde se presentó mayor consumo de oxígeno; mayor producción de biomasa y mayor velocidad de oxidación de los sustratos. Sin embargo, como puede observarse en las figuras 8 y 13, las curvas de crecimiento bacteriano no presentaron un perfil de comportamiento típico; es decir, una fase latente, seguida de una fase de crecimiento exponencial y posteriormente una fase estacionaria. Lo anterior posiblemente se debió a la falta de puntos de muestreo intermedios principalmente en la etapa inicial del experimento. Por lo tanto, a efecto de un mejor entendimiento de la dinámica de crecimiento bacteriano y, en general, del proceso de biotransformación, se sugiere incluir un mayor número de puntos de muestreo, lo que permitirá detectar la máxima abundancia de bacterias. Cabe señalar que, de acuerdo con la etapa experimental previa (Fig. 5), los puntos de muestreo a incluir serían el tercer y quinto día del inicio del experimento. De manera notoria, se observó que a partir del segundo punto de muestreo existe una disminución de bacterias, tanto estimadas mediante cuenta total como en grupos bacterianos tróficamente activos. Como posibles explicaciones a este fenómeno se pueden considerar las siguientes:

- En el caso de la prueba OECD 301-A modificada, puede atribuirse al agotamiento de los sustratos disponibles para biodegradación, lo cual se traduce en que la fuente de carbono y de energía se vuelven limitantes para la proliferación de las bacterias.
- En el caso de la prueba OECD 301-A no modificada, a la disminución drástica de la concentración de oxígeno molecular disuelto indispensable para el proceso de biodegradación aerobia, lo que a su vez repercute en una menor velocidad de síntesis celular (reproducción).

Usualmente, los cambios poblacionales que se presentan en una comunidad acuática están directamente asociados con los factores fisicoquímicos y biológicos que les rodean (Luna-Pabello *et al.*, 1994). Los procesos biológicos se basan en el establecimiento de un ecosistema adecuado, con las condiciones ambientales que favorezcan la actividad de los microorganismos, por lo que al no existir, se vuelven factores limitantes para incrementar su abundancia.

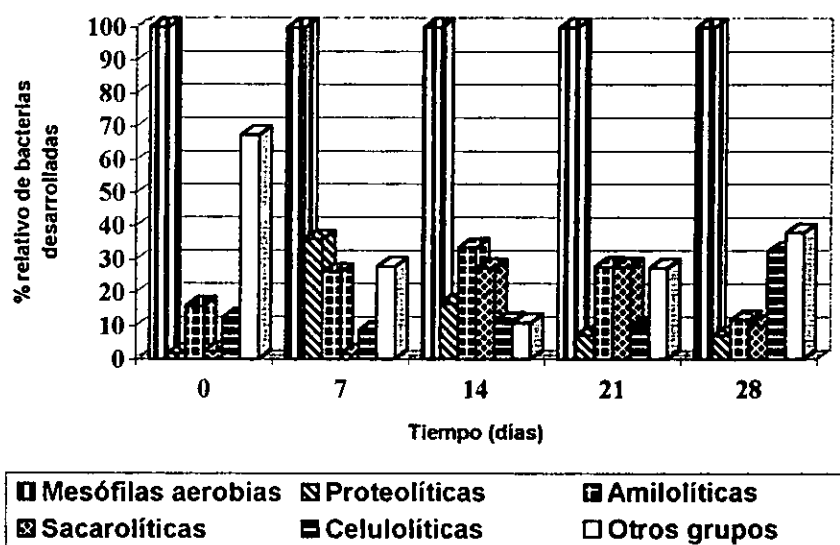
Como se puede observar en las figuras 18 y 19, los grupos bacterianos tróficamente activos no mostraron un crecimiento homogéneo en cuanto a número y tiempo transcurrido de la etapa experimental en que representan el máximo de la población, por lo que es factible inferir que las poblaciones bacterianas se suceden conforme transcurre el tiempo de incubación de la prueba de biodegradabilidad aerobia rápida.

Es importante señalar que el 100% de la población representado como bacterias mesófilas aerobias, no es siempre igual en términos de concentración o abundancia bacteriana; este criterio se adoptó con fines comparativos y para contar con una base de cálculo para los porcentajes relativos de los diferentes grupos tróficos bacterianos. De esta manera, las gráficas generadas, permiten hacer un seguimiento aproximado de los cambios relativos en las poblaciones bacterianas con respecto al tiempo.



**Figura 18. Porcentaje relativo de los diferentes grupos bacterianos tróficamente activos en muestras obtenidas de la prueba OECD 301-A modificada**

Como se puede observar en las figuras 18 y 19, el desarrollo de algunos grupos bacterianos tróficamente activos, de acuerdo con las gráficas de porcentajes relativos, tuvo un comportamiento normal. Esta observación es clara en el caso de las bacterias proteolíticas, que presentan su máximo desarrollo en porcentaje relativo a los 7 días de incubación; mientras que las bacterias amilolíticas y sacarolíticas registran ese máximo alrededor de los 14 días, cuando la actividad de las bacterias proteolíticas ha comenzado a decaer. Estos resultados permiten suponer que en el medio se presentan una serie de fenómenos, tales como reacciones múltiples, disponibilidad de sustrato, mejores condiciones para metabolizar un sustrato en particular, cambios en la producción de enzimas, etcétera; lo que finalmente ocasiona la variación de los porcentajes relativos de los grupos bacterianos tróficamente activos a lo largo del período de biodegradación evaluado. La biodegradación de sustratos involucra condiciones fisicoquímicas y microbiológicas en un ambiente en particular y la interacción de todos estos factores refleja la complejidad de los sistemas biológicos.



**Figura 19. Porcentaje relativo de los diferentes grupos bacterianos tróficamente activos en muestras obtenidas de la prueba OECD 301-A no modificada**

Entre los principales factores que afectan la sucesión de especies se pueden contar la disponibilidad de materia orgánica asimilable como alimento y el oxígeno disuelto (cabe recordar que la respuesta a la presencia de oxígeno molecular disuelto entre las distintas especies bacterianas varía notablemente). Otros factores importantes son la presencia o generación de sustancias tóxicas en el medio y las variaciones en las condiciones del proceso (temperatura, pH, carga orgánica, etcétera). La modificación de los niveles de uno de estos parámetros provoca la aparición o desaparición de cierto número de especies, sucumbiendo más rápidamente las más sensibles a tales cambios. Además de los factores fisicoquímicos ya mencionados, hay otros de naturaleza biológica que ejercen su influencia sobre la actividad de los microorganismos acuáticos, como por ejemplo, las relaciones que se establecen entre las diferentes especies (competencia, simbiosis, comensalismo, etcétera). Del análisis de las figuras 18 y 19 es posible inferir que se entabló el fenómeno de competencia entre los microorganismos presentes, ello debido al uso del mismo sustrato el cual eventualmente se transforma en un factor limitante junto con el espacio vital disponible.

Un resultado de la competencia es la mejor adaptación de los microorganismos al medio y la óptima explotación del recurso, lo que a su vez repercute en el mayor crecimiento de la población; lo que en ambientes cerrados dará origen a la alta generación de metabolitos secundarios que inhiben el crecimiento de los microorganismos que los producen. Normalmente, las poblaciones sobrevivientes son las que tienen la más alta tasa de crecimiento. No obstante, si las condiciones ambientales cambian, esto pueda dar lugar a un organismo distinto con la misma tasa de crecimiento y por lo tanto inducir la existencia de una nueva especie dominante, presentándose así el fenómeno de competencia.

Entre las bacterias aisladas en los medios de cultivo empleados para su cuenta, las que pudieron ser identificadas por medio de observación de características macroscópicas, morfología microscópica y pruebas bioquímicas, fueron *Bacillus* spp, *Acinetobacter calcoaceticus* var *anitricans* y var *twoffii*. A continuación se presentará una reseña sobre las especies antes mencionadas.

El género *Bacillus* comprende a los bacilos esporulados Gram positivos, miden de 0.8 a 1.5  $\mu\text{m}$  de ancho por 3 a 9  $\mu\text{m}$  de largo, son móviles y tienen cápsulas constituidas por polímeros de aminoácidos. Se consideran como Gram positivas, pero esta característica suele variar y se agrupan en cadenas que semejan cañas de bambú (Fig. 25). Su porcentaje de G+C va de 32 a 62%. Estos microorganismos no son exigentes en cuanto a sus requerimientos nutrimentales y pueden desarrollarse en cualquier medio sencillo. Aunque algunas cepas se comportan como facultativas, por lo general se acepta que el género es aerobio estricto. Las condiciones óptimas para su cultivo en el laboratorio son 18 a 24 horas de incubación a 35°C. Las colonias de este género suelen ser grandes, de 4 a 7 mm de diámetro, blancas o grisáceas, planas y con bordes irregulares. Son microorganismos quimioorganótrofos de metabolismo estrictamente respiratorio, estrictamente fermentativo o de ambos tipos. En cadena respiratoria, utilizan el oxígeno molecular como último aceptor de electrones, aunque también pueden emplear nitratos. El género *Bacillus* es muy activo en cuanto a la gran diversidad de sustratos que



puede utilizar, por lo que el número de pruebas bioquímicas que se emplean para diferenciar cada especie se encuentra entre 20 y 30.

La mayor parte de las especies de *Bacillus* son formas saprófitas del suelo. *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. sphaericus* y *B. circulans* destacan entre los principales miembros del género que pueden encontrarse en el ambiente, por lo cual no es raro observarlos en materias primas, productos terminados, medios de cultivo mal preparados y aguas residuales.

Por su parte, *Acinetobacter calcoaceticus* es una bacteria en forma de coco Gram negativo muy corto, su tamaño va de 1.0 a 1.5  $\mu\text{m}$  de ancho por 1,5 a 2.5  $\mu\text{m}$  de largo en fase log, se agrupa en forma de pares o cadenas cortas (Fig. 26). Sus colonias van de 2 a 3 mm de diámetro, después de 24 horas de incubación. Las colonias son suaves, algunas extremadamente mucoides y adherentes al sustrato. Se extienden por la superficie del medio, lo que indica muy poca movilidad, algunas producen un olor característico y desagradable. Es una bacteria aerobia estricta, con una temperatura óptima de crecimiento de 30 a 32°C y un pH óptimo de 7 unidades. Su porcentaje de G+C va de 40 a 47%. Es un microorganismo quimiorganótrofo con metabolismo oxidativo, versátil para utilizar compuestos orgánicos como fuente de carbono y energía. Asimismo, no presenta requerimientos de crecimiento específicos (Freeman, 1989; Jo y Finegold, 1990).

En cuanto a las características bioquímicas de *Acinetobacter calcoaceticus* se puede destacar que es catalasa positivo, oxidasa negativo, no produce acetoina, indol o ácido sulfhídrico no la no desamina la fenilalanina; así como, la ornitina y la lisina no son descarboxiladas. El citrato y otros compuestos orgánicos pueden o no ser utilizados. De igual manera puede o no producir ácidos a partir de la fermentación de azúcares; si ello ocurre es por medio de una aldolasa deshidrogenasa inespecífica con actividad sobre L-arabinosa, D-xilosa, D-ribosa, D-glucosa y otros carbohidratos. En general, no reducen los nitratos, por lo que esta prueba permite distinguir entre las cepas denominadas *lwoffii* que sí lo pueden reducir y las cepas que no reducen los nitratos se denominan *anitricans*. Con respecto a la prueba de reducción de nitratos

(Fig. 27), se valora la capacidad de los microorganismos anaerobios facultativos de utilizar como aceptor final de electrones al nitrato en ausencia de oxígeno. Los nitratos son reducidos a nitritos, óxidos de nitrógeno o nitrógeno molecular, dependiendo del microorganismo del que se trate (Jo y Finegold, 1990). Para realizarla, se utiliza un medio basal con una concentración de nitrato de potasio de 0.1%. Al agregar el reactivo de Griess, después de 24 horas de incubación a 35°C, se observa que:

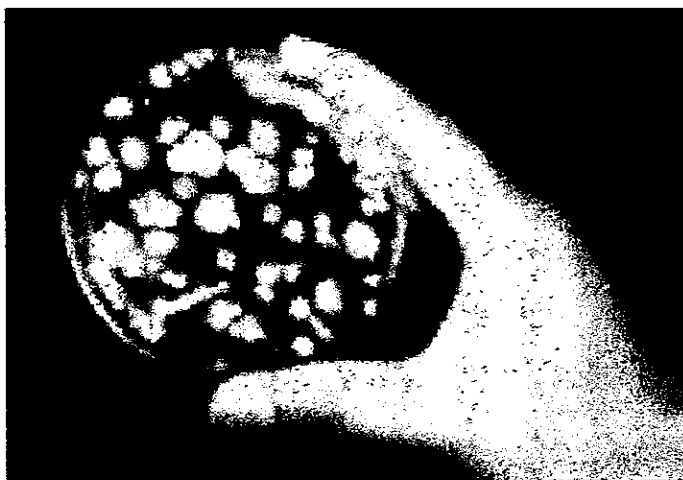
- El desarrollo de una coloración rojiza después de 30 segundos, indica la presencia de nitritos y representa una prueba positiva de reducción de nitratos
- La ausencia de color indica que los nitratos no fueron reducidos (prueba negativa) o que fueron reducidos a productos diferentes, como amoníaco.

Como con esta reacción sólo se detectan nitritos, es necesario añadir zinc a todas las reacciones negativas. Los iones zinc, reducen los nitratos a nitritos y el desarrollo de color rojo indica la presencia de nitratos residuales, confirmándose el resultado negativo.

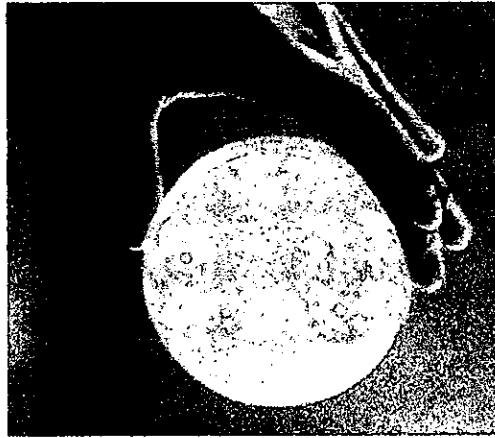
*A. calcoaceticus* es una bacteria saprófita de vida libre que puede ser encontrada en agua y suelos. Se ha observado que *A. calcoaceticus* es uno de los microorganismos responsables de la remoción de fosfatos en aguas residuales.

Finalmente, es importante destacar que las bacterias identificadas pueden no ser las únicas presentes en el inóculo; sin embargo, de acuerdo a la forma de selección descrita en el Capítulo 5 (Materiales y métodos), es probable que se hayan seleccionado las mismas colonias en todos los medios. Otra cuestión a considerar es que se cuantificaron e identificaron las bacterias que tienen la capacidad de crecer en esos medios, así que si en el agua residual se desarrollaron otro tipo de bacterias (por ejemplo, nitrificantes), es muy probable que éstas no hayan sido cuantificadas, debido a que requieren de otro tipo de medios para su desarrollo.

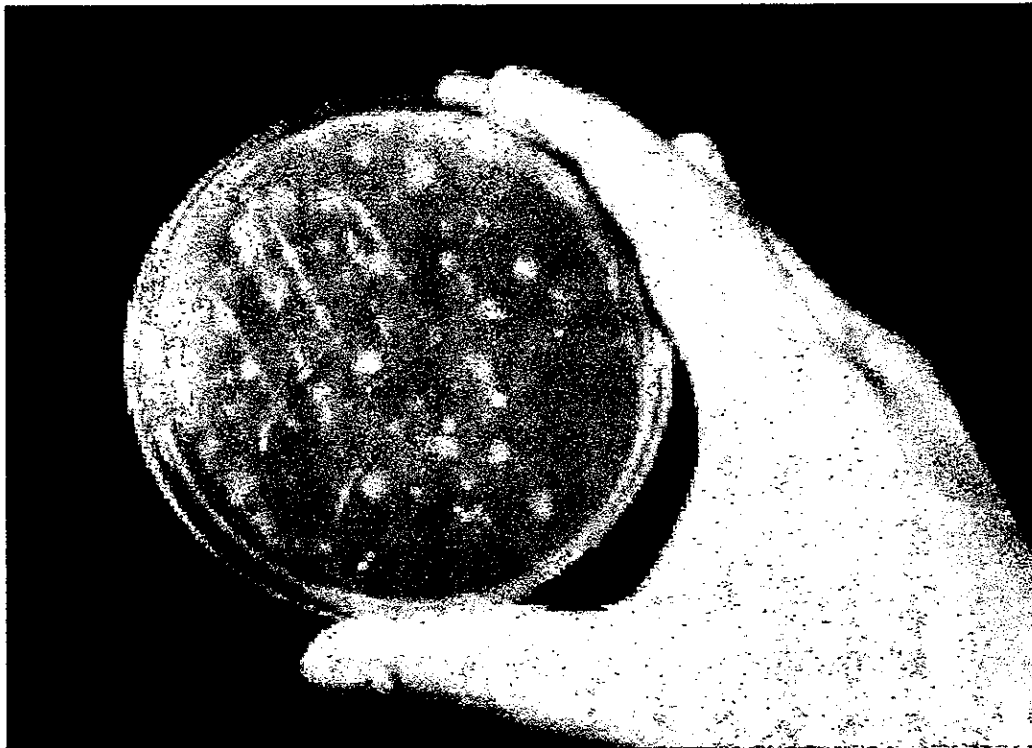
En las siguientes figuras se muestran las colonias bacterianas desarrolladas en los diferentes medios de cultivo empleados durante la etapa experimental. En ellas es posible observar los cambios en la superficie del medio de cultivo después del período de incubación que permiten la identificación de cada grupo bacteriano tróficamente activo; por ejemplo, la presencia de halos producidos por la hidrólisis de la caseína en el agar leche descremada (Fig. 21) o la presencia de colonias con halos transparentes o amarillos después de la adición de lugol al agar almidón, para la identificación de bacterias con actividad amilolítica (Fig. 23). Estos cultivos sirvieron para establecer las características macroscópicas de las colonias bacterianas seleccionadas. De igual manera, se presentan las tinciones de Gram que permitieron observar la morfología microscópica. Por último se presenta una figura con los resultados de la prueba de reducción de nitratos que sirvió para diferenciar entre las variedades de *Acinetobacter calcoaceticus* aisladas de los medios de cultivo.



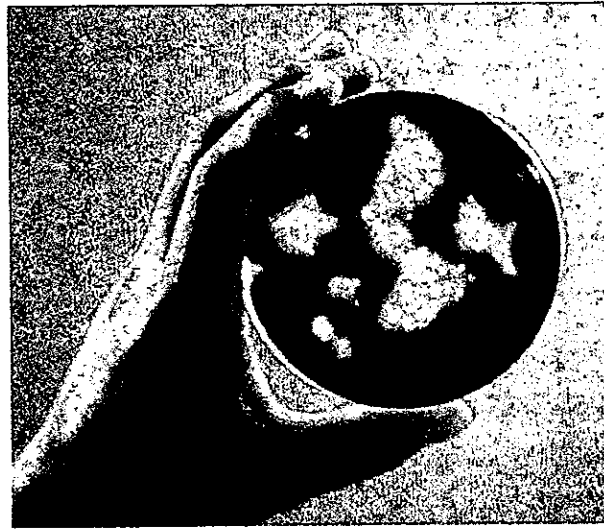
**Figura 20. Bacterias mesófilas aerobias desarrollas en agar-nutritivo**



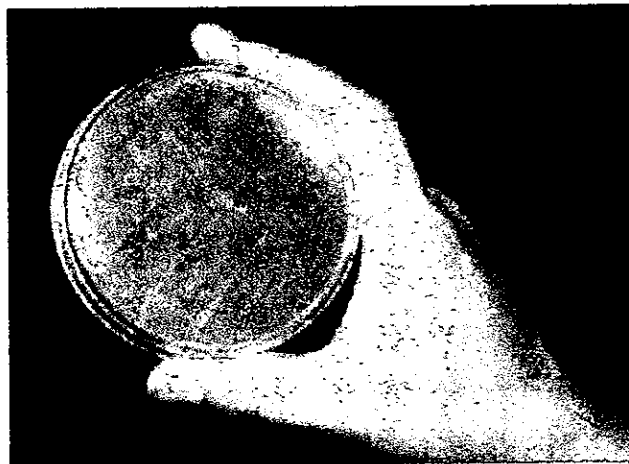
**Figura 21. Bacterias proteolíticas desarrolladas en agar-leche descremada**



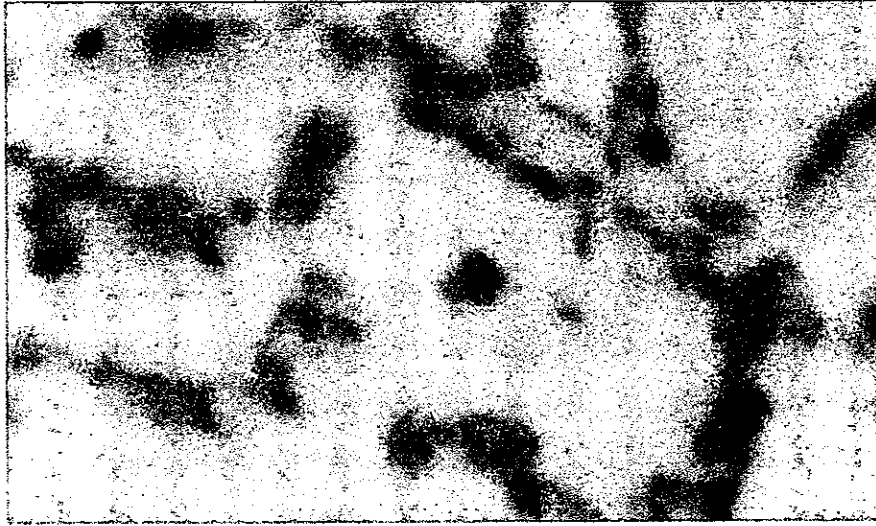
**Figura 22. Bacterias sacarolíticas desarrolladas en un medio mínimo con sacarosa**



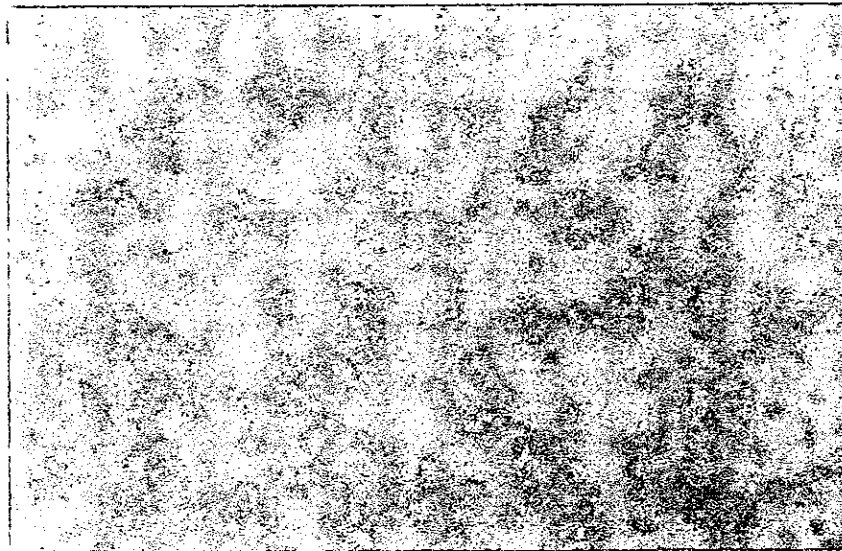
**Figura 23. Bacterias amilolíticas desarrolladas en agar-almidón**



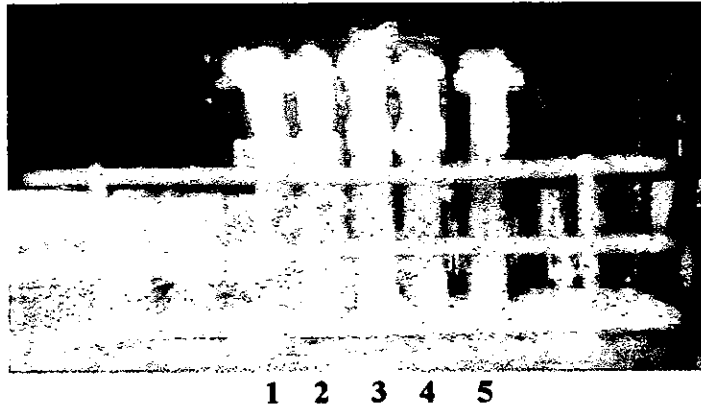
**Figura 24. Bacterias celulolíticas desarrolladas en agar-celulosa**



**Figura 25. Tinción de Gram mostrando *Bacillus* spp. Bacilos esporulados Gram positivos (100x)**



**Figura 26. Tinción de Gram mostrando *Acinetobacter calcoaceticus*. Cocobacilos Gram negativos (100x)**



**Figura 27. Resultados de la prueba de reducción de nitratos para la diferenciación de las variedades de *Acinetobacter calcoaceticus***

**1 y 3. Pruebas negativas (*Acinetobacter calcoaceticus* var *anitricans*)**  
**2, 4 y 5. Pruebas positivas (*Acinetobacter calcoaceticus* var *lowffi*)**

Con base en los resultados obtenidos y la discusión de los mismos, fue posible llegar a las conclusiones que se presentan en el siguiente capítulo, así como plantear las recomendaciones para continuar con este tipo de estudios de biodegradabilidad aerobia rápida.

# **CAPÍTULO SÉPTIMO**

## **CONCLUSIONES**

**Y**

## **RECOMENDACIONES**



---

## 7.1. CONCLUSIONES

- Las pruebas de biodegradabilidad aerobia rápida permiten obtener información acerca de la biodegradabilidad de una sustancia en un tiempo relativamente corto (28 días). Esta información puede considerarse como una primera aproximación para comprender cual será el comportamiento de una sustancia al ser puesta en contacto con una población microbiana presente en el ambiente.
- El montaje y aplicación de pruebas de biodegradabilidad aerobia rápida en nuestro país es una alternativa factible a nivel de laboratorio y ello permitiría tener un criterio para poder clasificar de manera adecuada si una sustancia es o no rápidamente biodegradable. Sin embargo, es indispensable considerar y ahondar en la solución de los problemas técnicos que pueden presentarse para su aplicación, como puede ser la necesidad de contar con equipo sofisticado para determinar la concentración de carbono orgánico disuelto o poder disponer de un respirómetro para realizar la prueba.
- La información generada a partir de las pruebas de biodegradabilidad aerobia rápida depende de las condiciones del sistema (pH, concentración de oxígeno disuelto disponible, aporte de oxígeno continuo) en el que se realiza la evaluación. De acuerdo con el procedimiento empleado para la realización de la prueba, la sustancia estudiada puede o no ser considerada como rápidamente biodegradable, al aplicar los criterios establecidos por las normas existentes.
- Para la correcta interpretación de los resultados obtenidos de la aplicación de una prueba de biodegradabilidad aerobia rápida, es imperativo aclarar en qué condiciones se realizó el ensayo; así como la preparación de las muestras bajo estudio y la procedencia del inóculo. De otra manera, es posible clasificar las sustancias erróneamente y/o no contar con

---

resultados y observaciones valiosas que permitan reproducir y profundizar en el conocimiento de las sustancias estudiadas

- Como resultado de la prueba de biodegradabilidad aerobia rápida OECD 301-A no modificada, se obtuvo un 68.3% de remoción de materia orgánica medida como carbono orgánico soluble en 28 días, mientras que con la aplicación de la prueba OECD 301-A modificada empleando el respirómetro automático se obtuvo un 89.5% en el mismo lapso. En consecuencia, estrictamente hablando, bajo el procedimiento no modificado no puede considerarse la muestra evaluada como rápidamente biodegradable, ya que no se logró remover por lo menos el 70% de materia orgánica disuelta, mientras que con el procedimiento modificado sí lo resulta. La pequeña diferencia en el nivel de aceptación puede deberse a la presencia de oxígeno disuelto, lo que debe de servir como punto de reflexión sobre la aplicación del procedimiento.
- La presencia de oxígeno molecular disuelto es un factor determinante para la realización de una prueba de biodegradabilidad aerobia rápida. Lo anterior se debe a que el porcentaje de remoción de materia orgánica está directamente determinado por la disponibilidad de oxígeno molecular disuelto.
- Al utilizar un respirómetro automático, se elimina el factor limitante para que el proceso de biodegradación se lleve a cabo bajo condiciones aerobias. Esto es factible gracias al aporte de oxígeno constante y de acuerdo con el requerimiento de cada muestra en particular.
- La utilización del respirómetro automático permite el estudio de la sustancia de prueba a concentraciones más altas que las recomendadas por las normas consultadas, lo que elimina la necesidad y el inconveniente de realizar diluciones muy altas de la sustancia de prueba. Esto es muy importante en este caso en particular, ya que bajo las condiciones de la Ciudad de México solamente se cuenta con 7 mgOD/L y para que el proceso de biodegradación se

---

considerare como aerobio deben existir al menos 2 mgOD/L, por lo que únicamente se podría disponer de 5 mgOD/L para que los microorganismos lo consuman a lo largo de 28 días de prueba.

- La tasa de consumo de oxígeno por día y la velocidad de consumo de oxígeno estuvieron directamente influidas por la concentración de materia orgánica disuelta presente en medio acuoso y la cantidad de microorganismos que participan en el proceso de biodegradación.
- La realización de una etapa experimental previa permitió el manejo adecuado de las técnicas fisicoquímicas y microbiológicas. De igual forma, se obtuvieron datos que sirvieron como punto de partida para conocer el comportamiento de la muestra seleccionada y sometida a un proceso de biodegradación aerobia
- Las condiciones particulares del sistema determinan el tipo de microorganismos predominantes; asimismo, se puede inferir su influencia en las enzimas expresadas para la biodegradación de las sustancias y la rapidez con que estas reacciones son llevadas a cabo.
- La naturaleza y el origen del inóculo microbiano son factores difíciles de controlar y que afectan directamente el resultado de la prueba de biodegradabilidad. Por lo tanto, es importante ahondar en el estudio de la preparación y estandarización del inóculo así como evaluar la conveniencia de dicha estandarización.
- Durante todos los experimentos realizados, se observó la estrecha relación que guardan entre sí la disminución paulatina de la materia orgánica disuelta con la abundancia de los grupos bacterianos tróficamente activos.
- Las bacterias identificadas se presentan normalmente tanto en aguas como en suelos. Tienen una amplia diversidad metabólica, lo cual les permite aprovechar muchos sustratos como

fuente de carbono y energía. Adicionalmente, son microorganismos poco exigentes en cuanto a condiciones ambientales y de nutrimentos, razón por la cual pueden vivir y proliferar abundantemente en este tipo de aguas residuales.

## 7.2 RECOMENDACIONES

Como sugerencia, para continuar con el desarrollo de estudios de biodegradabilidad aerobia rápida y profundizar en el conocimiento, comprensión y optimización del proceso de biodegradación en general, así como de este tipo de aguas residuales agroindustriales en particular se propone:

- Realizar más ensayos de biodegradabilidad aerobia para contar con datos que permitan validar la técnica empleada.
- Investigar sobre la posibilidad de emplear otro tipo de absorbente para la captación del dióxido de carbono producido en los matraces de reacción del respirómetro automático. Se ha observado, que la saturación del carbonato de calcio ocurre entre los 5 y 7 días; posteriormente, se comienza a registrar consumo de oxígeno en los blancos, ya sea sin materia orgánica o sin inóculo; lo que representa un factor de error en las determinaciones si no se realiza el ajuste de los datos antes de su procesamiento y discusión.
- Confirmar la presencia de los sustratos degradados por los grupos bacterianos tróficamente activos (proteínas, disacáridos, polisacáridos); así como la variación, en caso de que ello proceda sus concentraciones a lo largo del período de biodegradación estudiado.
- Evaluar la producción de metabolitos secundarios durante la aplicación de la prueba de biodegradabilidad aerobia rápida y su toxicidad, para investigar el posible efecto inhibitorio sobre el desarrollo de comunidades microbianas.

- 
- Aplicar la prueba de biodegradabilidad aerobia rápida a la muestra sin dilución, con objeto de estudiar la toxicidad de la muestra original sobre la población microbiana, que pudiera estar enmascarada por el uso de una dilución muy grande
  - Realizar el seguimiento de compuestos aromáticos y alifáticos presentes en la muestra de agua residual a lo largo del período de biodegradación estudiado, para conocer cualitativa y cuantitativamente que tipo de sustancias son biodegradadas y en que porcentaje. Esto podría realizarse por medio de técnicas cromatográficas y espectroscópicas.
  - Evaluar el proceso de nitrificación durante la fase experimental de degradación aerobia, tanto desde el punto de vista fisicoquímico (producción de nitritos, amonio, nitratos), como desde el punto de vista microbiológico (desarrollo de bacterias nitrificantes).
  - Realizar la caracterización de los grupos bacterianos desarrollados en las placas de cultivo durante toda la etapa experimental; para así poder conocer, de manera más adecuada los cambios poblacionales o el desarrollo de una especie en particular. Dicha información permitiría conocer los géneros y/o especies de bacterias mesófilas aerobias involucrados durante el proceso de biodegradación aerobia rápida de esta agua residual y con ello propiciar una biodegradación más rápida mediante la manipulación correcta de las variables adecuadas.
  - Emplear las bacterias *Acinetobacter calcoaceticus* var *anitricans*, *Acinetobacter calcoaceticus* var *lowffi* y *Bacillus* spp para evaluar su capacidad para degradar con sustratos específicos. También es recomendable, determinar sus cinéticas de crecimiento para ahondar en la dinámica de poblaciones identificadas y manipular de mejor manera el proceso de biodegradación.

- 
- Promover el desarrollo específico de algún grupo microbiano para optimizar el proceso de biodegradación. Para ello considerar factores como temperatura, concentración de oxígeno disuelto, pH, carga orgánica, tipo y concentración de sustratos, etcétera. Estas actividades se realizarían a efecto de propiciar y/o aumentar la biodegradación de algún compuesto en particular.
  - Aplicar este tipo de estudios de biodegradabilidad a otras aguas residuales (industriales, agroindustriales) para comprender mejor el proceso y poder optimizar los métodos de tratamiento. Estas actividades se realizarían a efecto de conocer el comportamiento de los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos del agua residual sometida a un proceso de biodegradación aerobia, así como propiciar y/o aumentar la biodegradación de algún compuesto en particular.
  - Aplicar este tipo de estudios a hidrocarburos, fluidos de perforación y otros residuos de la industria petrolera, ya que es una de las más importantes en nuestro país y también una de las más criticadas por su impacto ambiental. Este tipo de pruebas, servirían para conocer el comportamiento de este tipo de contaminantes y posteriormente diseñar y aplicar técnicas de biorremediación, con mayor conocimiento de los factores que pueden afectar los resultados obtenidos. Cabe recordar que este tipo de pruebas no son concluyentes, ya que la extrapolación a pruebas de campo esta influida por muchos otros factores difíciles de predecir y controlar.
  - Adaptar la prueba de biodegradabilidad aerobia rápida para la evaluación de compuestos orgánicos de baja solubilidad.

**CAPÍTULO NOVENO. BIBLIOGRAFÍA**

1. Alexander, M. 1981. Biodegradation of chemicals of environmental concern. *Science*. 211: 132-138.
2. Albert, L. A., Lopez, S. M. y Flores, J. 1995. Diccionario de la contaminación. Centro de Ecología y Desarrollo. México D.F. México. 85 pp.
3. Anónimo. 1990. *Efluentes de deshidratadoras. Reporte final*. Pub. Laboratorios Bioquimex, S.A. de C.V. México D.F. México. 67 pp.
4. APHA. 1992. *Métodos normalizados para aguas potables y residuales*. Ediciones Díaz de los Santos. Madrid, España. 915 pp.
5. Avilés, R. D., Cortés, G. A., Eusebio, H. G., Flores, V. M., Lugo, F.G., Mota, G. L., Mora, F. J., Padierna, O. M. y Rodríguez, M. R. 1983. *Manual de laboratorio de microbiología sanitaria*. Instituto Politécnico Nacional. México D.F. México. 264 pp.
6. Armendáriz, J. F., Ambriz, R. K. T., Luna-Pabello, V. M. y Durán de Bazúa, C. 1997. Biodegradación y análisis microbiológico de aguas residuales provenientes del ensilado y prensado del cempasúchil (*Tagetes erecta*). En *Memorias del VII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería y II Simposio Internacional sobre Ingeniería de Bioprocesos*. Mazatlán, Sinaloa. México septiembre 8-12, 1997. pp 240.
7. Armendáriz, J. F. 1998. *Estudio de tratabilidad biológica de las aguas residuales del ensilado y prensado del cempasúchil (Tagetes erecta)*. Tesis profesional. Facultad de Ciencias, UNAM. México D.F. México. 95 pp.
8. Bouwer, E. J. 1992. Bioremediation of organic contaminants in the subsurface. En *Environmental Microbiology*. Mitchell R.Wiley-Liss, Inc. Nueva York, E.E.U.U.A. pp 287-289.
9. Bouwer, E. J. y Zehnder, A. B. J. 1993. Bioremediation of organic compounds - putting microbial metabolism to work. *TIBTECH*. 11: 360-367.
10. Boyd, R. F. 1984. *General Microbiology*. Times Mirror Mosby College Publishing. E.E.U.U.A. pp 410-413.

11. Brown, C. M., Campbell, Y. y Priest, F. G., 1989. *Introducción a la biotecnología*. Acribia S. A., Barcelona, España. 143 pp.
12. Casarrubias-García, M., Hernández-Hernández, J. G., Briones-Méndez, R. y Durán-de-Bazúa, C. 1996. *Degradación anaerobia de aguas derivadas del ensilado y prensado del cempasúchil (Tagetes erecta)*. Informe técnico del proyecto CEMPA-01-96. Publicación del Programa de Ingeniería Química Ambiental y Química Ambiental. Facultad de Química UNAM. México D.F. México. 101 pp.
13. Chávez-Sánchez, I., Ramírez-Burgos, L. I., Pedroza-Islas, R. y Durán-de-Bazúa, C. 1995. *Tratamiento aerobio de aguas diluidas de cempasúchil en un reactor de biodiscos*. Informe técnico del proyecto CEMPA-01-95. Publicación del Programa de Ingeniería Química Ambiental y Química Ambiental. Facultad de Química UNAM México D.F. México. 93 pp.
14. DIFCO. 1990. *Dehydrated culture media and reagents for microbiological and clinical laboratory procedures*. Michigan, E.E.U.U.A. 348 pp.
15. Durán-de-Bazúa, C. 1993. *Tratamiento biológico de aguas residuales de la industria de proceso*. Departamento de Alimentos y Biotecnología, División de Ingeniería y Programa de Ingeniería Química Ambiental y Química Ambiental. Pub. PIQAYQA, Facultad de Química, UNAM. México D.F. México. 141 pp.
16. Durán-de-Bazúa, C., Briones, R., Picaso, R. M., Ramírez-Burgos, I., Casarrubias, M., Chávez, I. y Hernández, G. 1994. *Biodegradación de aguas de origen agroindustrial. Estudio de las aguas de proceso de cempasúchil. (Tagetes erecta)*. Primer informe técnico CEMPA-01-93. Pub. UNAM, PUMA-PIQAYQA. México D.F. México. 100 pp.
17. Eckenfelder, W. W. y Grau, P. 1992. *Water Quality Management Library Vol.1— Activated sludge process design and control theory and practice*. Technomic. Pennsylvania, E.E.U.U.A. pp 170-172.
18. Freeman, B. A. 1989. *Microbiología de Burrows*. Interamericana McGraw Hill. México, D.F., México. 1181 pp.
19. Grady, L. 1985. Biodegradation: Its measurement and microbiological basis. *Biotechnol. Bioeng.* 27 : 660-674



20. Granados-Hernández, E., López-Andrade, X., Pandiyan, T. y Durán-de-Bazúa, C. 1996. *Identificación de algunos compuestos presentes en las aguas de proceso del cempasúchil*. Informe técnico del proyecto CEMPA-02-96. Publicación del Programa de Ingeniería Química Ambiental y Química Ambiental. Facultad de Química UNAM México D.F. México. 73 pp.
21. Gutiérrez Rojas, M. 1997. Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados de la industria petrolera. En *Memorias del VII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería y II Simposio Internacional sobre Ingeniería de Bioprocesos*. Mazatlán, Sinaloa. México septiembre 8-12, 1997. pp 21.
22. Hach, C. C., Klein, R. L. y Gibbs, C. R. 1995. *Introduction to biochemical oxygen demand*. Technical information series, booklet no.7. pp 3-8.
23. Heritage, J., Evans, E. G. V. y Killington R. A. 1996. *Introductory Microbiology*. Cambridge University Press. Londres, Reino Unido. pp 101-111, 132-135.
24. ISO. *Water quality — Evaluation in an aqueous medium of the "ultimate" aerobic biodegradability of organic compounds — Method by analysis of dissolved organic carbon (DOC)*. ISO 7827:1994 (E). International Standardization Organization. Ginebra, Suiza. pp 1-7.
25. Jo, B. E. y Finegold, S.M. 1990. *Bayley and Scott's. Diagnostic microbiology*. Times Mirror Mosby College Publishing. E.E.U.U.A. pp 400-403.
26. Klaassen, C. D. 1991a. Metales pesados y antagonistas de los metales pesados. En *Goodman y Gilman. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. Goodman A. Editorial Médica Panamericana. México D.F. México. pp 1537-1550.
27. Klaassen, C. D. 1991b. Tóxicos ambientales no metálicos: contaminantes del aire, solventes y vapores y plaguicidas. En *Goodman y Gilman. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. Goodman A. Editorial Médica Panamericana. México D.F., México. pp 1573-1574.
28. Koneman, E. W., Allen, S. D., Dowell, V. R., Janda, W. M., Sommers, H. M. y Winn, W. C. 1992. *Diagnóstico microbiológico*. Editorial Médica Panamericana, 3a. edición. Buenos Aires, Argentina.

29. Lehninger, A. L. Nelson D. L. y Cox. M. M. 1993. *Principios de bioquímica*. Ediciones Omega. Madrid, España. 1011 pp.
30. Luna-Pabello, V. M., Aladro Lubel, M. A. y Durán-de-Bazúa, C. 1994. *Efecto del sustrato sobre poblaciones de ciliados en un reactor de biodiscos. Casos tipo: Nejayote, vinazas y aguas blancas del papel*. Serie Química Ambiental del agua. Volumen 2. Facultad de Química, UNAM. México D.F. México. 227 pp.
31. MacFaddin, J.F. 1990. *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia médica*. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina.
32. Manual de VOITH-Sapromat B-12. 1996. VOITH-SULZER. Stoffaufbereitung GmbH. Alemania. 20 pp.
33. McKinney, R. E. 1962. *Microbiology for sanitary engineers*. Mc Graw Hill Book Co. Nueva York, E.E.U.U.A. pp 172-177, 195-197.
34. Metcalf y Eddy. 1991. *Wastewater engineering. Treatment, disposal, reuse*. Mc Graw Hill Book Co. Nueva York, E.E.U.U.A. pp 89-90, 367-369, 430-433.
35. Muñiz, R. R. 1987. *Evaluación comparativa del funcionamiento de modelos físicos de laboratorio de lagunas anaerobias tratando aguas residuales de excretas de cerdo*. Tesis profesional. Facultad de Ciencias, UNAM. México D.F. México. 106 pp.
36. Muxi-de-Abreu, L. 1994. *II Taller Seminario Latinoamericano "Tratamiento anerobio de aguas residuales"* Montevideo, Uruguay. pp 55-62.
37. OECD. 1992a. *Guidelines for testing of chemicals. Section 3. Degradation and bioaccumulation*. Organization for Economic Cooperation and Development. París, Francia. pp 1-10.
38. OECD. 1992b. *Guidelines for testing of chemicals. Ready biodegradability. 301 A. "DOC Die-away test"* Organization for Economic Cooperation and Development. París, Francia. pp 1-18.
39. Pelczar, M. J., Chan, E. C. S. y Krieg, N. R. 1991. *Microbiology*. McGraw Hill Book Co. pp 119-121.
40. Pitter, P. 1976. Determination of biological degradability of organic substances. *Wat. Res.* 10: 231-235.

41. Ramírez-Gama, R. M., Luna, M. B., Mejía, Ch. A., Velázquez, O., Tsuzuki, R. G., Vierna, L. y Múggenburg, Y. 1992. *Manual de Prácticas de Microbiología General*. Facultad de Química, UNAM, México D. F. México. 318 pp.
42. Romero, C. R. 1993. *Microbiología*. Editorial Médica Panamericana. México D.F., México. 750 pp.
43. Schade, M. y Lemmer, H. 1994. Counting bacteria of selected metabolic groups in activated sludge — an assessment of methods. *Wat. Sci. Technol.* 29 (7): 75-79.
44. Sharma, B. y Ahlert, R. C. 1977. Nitrification and nitrogen removal. *Wat. Res.* 11: 897-925.
45. Slater, M., Hille, M. H., y Molversmyr, R. F. 1995. Commonly used biodegradation techniques for drilling fluid chemicals, are they appropriate? *SPE/IADC 29376. SPE/IADC Drilling Conference*. Amsterdam, The Netherlands, febrero 28 - marzo 2, 1995. pp. 387-396.
46. Steffensen, W. S. y Alexander, M. 1995. Role of competition for inorganic nutrients in the biodegradation of mixtures of substrates. *Appl. Environ. Microbiol.* 61 (8): 2859-2862.
47. Tebutt, T. H. 1994. *Fundamentos de control de calidad de agua*. Editorial Limusa. México, D.F., México. 239 pp.
48. Tórtora, G.J., Funke, B.R. y Case, C.C. 1992. *Microbiology. An Introduction*. The Benjamin/Cummings Publishing Co. California E.E.U.U.A. pp. 682-692.
49. Trejo, M. R. y Quintero, R. 1997. Biorremediación de suelos contaminados con petróleo crudo. *Memorias del VII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería y II Simposio Internacional sobre Ingeniería de Bioprocesos*. Mazatlán, Sinaloa. México septiembre 8-12, 1997. pp 23.
50. Zamudio, A., Luna-Pabello, V.M. y Durán-de-Bazúa, C. 1993. Estudio de prefactibilidad de un sistema aerobio (biodiscos de tratamiento de vinazas de alcohol de caña). Informe técnico de trabajo VIN-01-93. Publicaciones de la Facultad de Química UNAM, UNEP, BMFT. México, D.F., México. 91 pp.

51. Zitomer, D. H. y Speece, R. E. 1993. Sequential environments for enhanced biotransformation of aqueous contaminants. *Environ. Sci. Technol.* 27 (2): 227-244.

**ANEXOS**

## ANEXO A. PRUEBAS DE BIODEGRADABILIDAD AEROBIA RÁPIDA CONSULTADAS

### Anexo A.1 301-A "Prueba de disminución de COD"

Año de publicación : 1992

**Nota:** Los recuadros fueron incluidos como comentarios para puntualizar los aspectos que no quedan claros después de revisar la prueba y que podrían sugerirse como modificaciones al procedimiento recomendado.

#### Introducción

Las características de interés general con respecto a las pruebas de biodegradabilidad son discutidas en "*Procedimientos generales y preparaciones*", se sugiere su consulta antes de iniciar el trabajo experimental. Para este método en especial, la sustancia de prueba debe tener una solubilidad en agua de al menos 100 mg/L y no ser volátil. El contenido de carbono orgánico disuelto (COD) y la pureza o cantidades relativas de los principales componentes de la muestra deben de preferencia ser conocidos. La prueba es prácticamente la misma que la ISO 7827-1984. Es similar a la prueba de OECD modificada (301E) y su diferencia radica en que permite el uso de densidades microbianas más altas.

#### Fundamento de la prueba

Un volumen determinado de medio mineral preinoculado, conteniendo una concentración conocida de la sustancia de prueba (entre 10 y 40 mg COD/L) como única fuente de carbono orgánico es mantenida con aireación constante en la oscuridad o con luz difusa a  $22 \pm 2$  °C. El curso de la degradación es monitoreado por medio del análisis de la concentración de COD<sup>1</sup> a intervalos frecuentes de tiempo durante un período de 28 días. El grado de biodegradación es calculado a partir de la cantidad de COD removida (corregida por medio de un blanco de inóculo utilizado como control) con respecto al porcentaje de la concentración inicialmente presente en el medio. También puede calcularse la biodegradación primaria del compuesto

original por medio de análisis químicos suplementarios realizados al principio y final del periodo de incubación.

1. COD es el carbono orgánico presente en solución o aquél que pasa a través de un filtro de membrana de  $0.45 \mu\text{m}$  o que queda en el sobrenadante después de centrifugar la muestra a  $40000 \text{ m/s}^2$  durante 15 minutos.

## Descripción del método

### Equipo

Material común de laboratorio y:

- Matraces erlenmeyer de 250 mL a 2 L, dependiendo del volumen necesario para realizar el análisis de COD. Los matraces deben ser cuidadosamente limpiados, por ejemplo con solución de ácido clorhídrico-alcohol<sup>2</sup>, enjuagados y secados antes de cada prueba.
- Agitador para contener los matraces cónicos, con control automático de temperatura o a temperatura ambiente constante y con suficiente fuerza como para mantener condiciones aerobias en todos los matraces.
- Aparato de filtración con membranas adecuadas
- Analizador de COD
- Medidor de oxígeno disuelto, para comprobar que los matraces se encuentran bajo condiciones aerobias
- Centrifuga

2. No se indica la concentración de esta solución, ya sea en normalidad (N) o por ciento en peso o volumen

### Agua

Debe de utilizarse agua desionizada o destilada, libre de concentraciones inhibitorias de sustancias tóxicas<sup>3</sup> (ejemplo  $\text{Cu}^{2+}$ ). No debe de contener más de un 10% de carbono orgánico disuelto, pues introduciría un error a la sustancia de prueba. Se requiere agua con alta pureza para eliminar valores altos del blanco. La contaminación del agua puede ser causada por impurezas propias, por las resinas de intercambio iónico y material lisado de bacterias y algas.

Para cada corrida de pruebas, usar un sólo lote de agua a la que previamente se le habrá determinado la concentración de COD presente.

3. No se especifican ni las sustancias que podrían considerarse como inhibitorias ni los límites máximos permisibles de dichas sustancias en el agua que va a ser utilizada

### Soluciones patrón de medio mineral

Preparar las siguientes soluciones patrón usando reactivos de grado analítico:

#### Solución a:

Fosfato monobásico de potasio, $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .....	8.50 g
Fosfato dibásico de potasio, $\text{K}_2\text{HPO}_4$ .....	21.75 g
Fosfato dibásico de sodio dihidratado, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .....	33.40 g
Cloruro de amonio, $\text{NH}_4\text{Cl}$ .....	0.50 g

Disolver en agua y aforar a 1 L. El pH de la solución debe ser 7.4

#### Solución b:

Cloruro de calcio, anhidro, $\text{CaCl}_2$ .....	27.50 g
o	
Cloruro de calcio dihidratado, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .....	36.40 g

Disolver en agua y aforar a 1 L

#### Solución c:

Sulfato de magnesio heptahidratado, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .....	22.50 g
---	---------

Disolver en agua y aforar a 1 L

#### Solución d:

Cloruro de hierro (III) hexahidratado, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ .....	0.25 g
--	--------

Disolver en agua y aforar a 1 L

**Nota:** En caso de no querer preparar la solución inmediatamente antes de su uso, añadir una gota de HCl concentrado o 0.4 g de EDTA por litro. Si se forma un precipitado en las soluciones patrón, reemplazarlas con soluciones recién preparadas.



### **Preparación del medio mineral**

Mezclar 10 mL de solución (a) con 800 mL de agua, añadir 1 mL de solución (b), (c) y (d). Aforar a 1 L con agua.

### **Soluciones patrón de sustancias de prueba**

Cuando la solubilidad de la sustancia de prueba excede 1 g/L, disolver 1-10 g, de sustancia de prueba o de referencia en agua y aforar a 1 L. Otra opción es preparar soluciones patrón en medio mineral o añadir la sustancia directamente al medio mineral, permitiendo su completa disolución antes de continuar con el procedimiento de montaje.

### **Inóculo**

El inóculo<sup>4</sup> puede derivarse de una gran variedad de fuentes: lodos activados, efluentes de aguas residuales, aguas superficiales, suelo o una mezcla de éstos.

4. El origen, edad, composición, tiempo y forma de adaptación, son determinantes para el desarrollo y funciones fisiológicas adecuadas de los microorganismos, por lo que, al no contar con un inóculo estandarizado los resultados de la prueba de biodegradación pueden no ser representativos y/o reproducibles. Sin embargo, la estandarización del inóculo representa una condición restrictiva a la biodegradación, ya que puede no contarse con poblaciones variadas desde el punto de vista metabólico. Este es un punto que habría que evaluar cuidadosamente.

### **Inóculo a partir de lodos activados**

Colectar una muestra fresca de lodos activados, a partir de un tanque de aireación de planta de tratamiento de aguas residuales o un reactor a escala de laboratorio que trate principalmente aguas residuales domésticas. Si es necesario, remover las partículas gruesas por filtración a través de un tamiz fino y mantener el lodo bajo condiciones aerobias.

Alternativamente, después de retirar las partículas gruesas, centrifugar (por ejemplo 1100 g durante 10 minutos)<sup>5</sup>. Descartar el sobrenadante. El lodo debe ser lavado con medio mineral. Resuspender el lodo concentrado en medio mineral para obtener una concentración final de 3-5 g de sólidos suspendidos /L. Mantener en aireación hasta su uso.

5. No se indica la equivalencia en revoluciones por minuto (rpm)

El lodo puede ser obtenido de una planta de tratamiento convencional. Sin embargo, si fue obtenido de una planta con alta tasa de tratamiento, o si se sospecha de la presencia de inhibidores, debe ser lavado<sup>6</sup>. Mezclar perfectamente el lodo y dejar sedimentar o centrifugar. Descartar el sobrenadante y resuspender el lodo lavado en el mismo volumen de medio mineral. Repetir el procedimiento hasta que se considere que el lodo está libre del exceso de sustrato o inhibidores.

6. Puede utilizarse solución salina isotónica (solución de NaCl al 0.9%) para el lavado, ya que permite eliminar las sustancias indeseables y no altera la tonicidad del medio, por lo tanto no es dañino para las bacterias

Después de resuspender por completo, o con el lodo sin tratar, tomar una muestra para la determinación del peso seco de los sólidos suspendidos.

Otra alternativa es homogenizar el lodo activado para obtener una concentración de 3-5 g de sólidos suspendidos/L. Tratar el lodo en una mezcladora a velocidad media durante 2 minutos. Dejar sedimentar el lodo mezclado por 30 minutos o más si se requiere, decantar el líquido que será utilizado como inóculo (10 mL/L de medio mineral).

7. Este término es ambiguo, ya que no se especifica la velocidad exacta

### Otras fuentes de inóculo

El inóculo puede obtenerse del efluente secundario de una planta de tratamiento o de un reactor de laboratorio que trate principalmente aguas domésticas. Colectar una muestra fresca y mantenerla bajo condiciones aerobias durante el transporte. Dejar sedimentar por 1 hora o filtrar a través de filtro de papel grueso. Guardar el sobrenadante decantado o filtrado aerobio hasta su uso. Este tipo de inóculo será utilizado en una proporción de más de 100 mL por litro de medio mineral.

Otra fuente de obtención del inóculo es el agua superficial. En este caso, coleccionar una muestra de agua superficial de río, lago, etcétera y mantenerla bajo condiciones aerobias hasta su uso. Si es necesario, concentrar el inóculo por filtración o centrifugación.

### **Preacondicionamiento del inóculo**

El inóculo puede ser preacondicionado<sup>8</sup>, pero no preadaptado a la sustancia de prueba. El preacondicionamiento consiste en mantener en aireación el lodo activado (en medio mineral) o el efluente secundario por 5-7 días a la temperatura de prueba. El preacondicionamiento en ocasiones provee de precisión al método de prueba, disminuyendo el valor del blanco.

8. Sin embargo, 1 semana de preacondicionamiento bajo estas condiciones puede hacer que los microorganismos mueran por falta de nutrientes, disminuyendo la población capaz de participar en la biodegradación, por lo que tanto tiempo puede no ser muy recomendable

### **Preparación de matraces**

A modo de ejemplo, tomar 800 mL de medio mineral<sup>9</sup> y colocarlos en matraces de 2 litros, añadir el volumen suficiente de solución patrón de la sustancia de prueba y de referencia, según sea el caso, para obtener una concentración equivalente entre 10 y 40 mg COD/L. Registrar el pH, ajustar el valor a 7.4. Inocular los matraces con el lodo activado u otra fuente de inóculo para obtener una concentración final no mayor de 30 mg sólidos suspendidos totales/L. Preparar también controles del inóculo en el medio mineral pero sin la sustancia de referencia.

9. Mantener en aireación durante 1 hora para permitir que la concentración de oxígeno disuelto sea de aproximadamente 7 mg por litro para la Ciudad de México a 2240 metros sobre el nivel del mar y una presión barométrica de aproximadamente 585 mmHg

De ser necesario, utilizar un matraz para verificar el posible efecto inhibitorio de la sustancia de prueba por medio de la inoculación de una solución conteniendo concentraciones comparables<sup>10</sup> de la sustancia de prueba y de referencia en el medio mineral.

10. No indica explícitamente que concentraciones se utilizan, pero deben de ser las mismas utilizadas para la preparación de la solución de sustancia de prueba y la solución de sustancia de referencia, por lo que deben estar entre 10 y 40 mgCOD/L, ambas se añadirían a la misma concentración

De igual manera, si se requiere verificar la degradación abiótica de la sustancia de prueba, utilizar un matraz conteniendo una solución estéril sin inóculo. Dicha solución se esteriliza a través de filtración por membrana (0.2-0.45 $\mu$ m) o mediante la adición de una sustancia tóxica a la concentración apropiada<sup>11</sup>. Si se utiliza la filtración a través de membrana, tomar las muestras asépticamente para mantener condiciones de esterilidad.

11. No indica la sustancia tóxica a emplear ni la concentración de sustancia tóxica que puede utilizarse

Adicionalmente, si se sospecha que la sustancia de prueba puede ser adsorbida en vidrio, lodo, etcétera., de acuerdo a los resultados obtenidos previamente, se debe incluir un matraz que contenga solución de sustancia de prueba, el inóculo y un agente esterilizante<sup>12</sup>.

12. No indica que agente esterilizante es el adecuado ni la concentración que puede utilizarse

Aforar todos los volúmenes a 1 L con medio mineral y mezclar perfectamente. Tomar una muestra de cada matraz para determinar la concentración inicial de COD por duplicado. Tapar los matraces con papel aluminio, de manera que se permita el libre intercambio de aire entre el matraz y la atmósfera circundante. Finalmente, colocar los matraces en la incubadora con agitación e iniciar la prueba.

13. No es clara la forma de explicar este punto en el documento consultado. Esta forma de tapar los matraces no parece ser la más adecuada, el libre flujo de aire causaría contaminación de los matraces estériles, además podría propiciar pérdidas por evaporación, ya que las sustancias ligeramente volátiles podrían perderse; por lo tanto deben contar con un tapón adecuado. Debe existir oxígeno disuelto disponible y debe permanecer un remanente de al menos 2 mg/L después de los 28 días de prueba para asegurar que la biodegradación se llevó a cabo bajo condiciones aerobias. En muestras con alta concentración de carbono orgánico disuelto se requiere el empleo de diluciones.

### Distribución de los matraces

En una corrida típica, se utilizan los siguientes matraces:

- Matraz 1 y 2 que contiene la sustancia de prueba y el inóculo (suspensión de prueba, una sola dilución)<sup>14</sup>.
- Matraz 3 y 4 que solamente contiene inóculo y medio mineral (blanco del inóculo).
- Matraz 5 que contiene el compuesto de referencia y el inóculo (control del procedimiento); y cuando sea necesario también incluir:
- Matraz 6 que contiene la sustancia de prueba y el agente esterilizante (control de degradación abiótico estéril).
- Matraz 7 que contiene la sustancia de prueba, el inóculo y el agente esterilizante (control de adsorción).
- Matraz 8 que contiene la sustancia de prueba, el compuesto de referencia y el inóculo (control de toxicidad).

14. Evaluar una sola concentración por duplicado puede no proporcionar datos confiables acerca de la biodegradabilidad de la sustancia de prueba, por lo que pueden incluirse más matraces, en función de las limitaciones técnicas del laboratorio

### Procedimiento

#### Cuantificación de COD

A lo largo del período de prueba, determinar las concentraciones de COD de las muestras en cada matraz por duplicado a intervalos de tiempo conocidos. Es obligatorio cuantificar la concentración de COD en la suspensión de prueba y el blanco del inóculo al mismo tiempo. Se recomienda monitorear la concentración de COD en los demás matraces. Sin embargo, esto no siempre es posible<sup>15</sup>.

15. Es deseable realizar el monitoreo de la disminución en la concentración de COD en todos los matraces en estudio para obtener resultados confiables de la prueba de biodegradación

## Muestreo

Tomar una muestra compuesta por el volumen mínimo de la suspensión de prueba necesaria para cada determinación de COD. Antes de realizar el muestreo eliminar cualquier pérdida por evaporación en los matraces, mediante adición de agua en la cantidad necesaria para recuperar el volumen anterior <sup>16</sup>. Mezclar perfectamente el medio de cultivo, para que el material adherido a la pared del matraz sea redissuelto o resuspendido. Filtrar a través de membrana o centrifugar la muestra inmediatamente después de ser tomada. Analizar el filtrado o centrifugado el mismo día, de otra manera almacenar a 2-4 °C por un máximo de 48 h o a -18 °C para períodos más largos.

16. Si los matraces son cerrados de una manera adecuada, la pérdida por evaporación debe ser casi nula. El agregar agua al matraz una vez iniciada la prueba ocasionará un efecto de dilución que afectaría la concentración de la sustancia de prueba o de referencia, con la resultante pérdida de lo que se está evaluando y modificación de las condiciones originales de los matraces

## Frecuencia de muestreo

Asegurar que un número suficiente de muestras sean tomadas para permitir valorar el porcentaje de remoción del período de 10 días a ser valorado. El nivel de aceptación para las pruebas de biodegradabilidad rápida aerobia es de 70% de remoción de COD, este debe ser alcanzado en un período de 10 días dentro de los 28 días que dura la prueba. El período de 10 días inicia cuando el grado de biodegradación ha alcanzado un 10% de COD y debe terminar antes del día 28 de la prueba. No se proponen tiempos de muestreo específicos<sup>17</sup>. Si los análisis son llevados a cabo el día del muestreo, programar la siguiente considerando los resultados del mismo. Si son preservadas, tomar muestras diariamente o cada 2 días. Analizar primero las últimas muestras (28 días), y por selección de muestras apropiadas, es posible obtener una buena descripción de la curva de biodegradación con relativamente pocas determinaciones<sup>18</sup>. Por supuesto, si las últimas muestras (28 días) no muestran degradación, el experimento se da por terminado.

17. Por lo menos deben considerarse intervalos de 7 días entre cada determinación para tener la mínima información acerca del proceso de biodegradación. Pueden establecerse más tiempos intermedios, esto en función de las limitaciones técnicas propias del laboratorio

18. Es recomendable analizar las muestras conforme se van obteniendo, para así tener mayor conocimiento sobre el proceso de biodegradación y realizar las adaptaciones pertinentes (por ejemplo incorporar tiempos de muestreo intermedios para un adecuado monitoreo del periodo donde se registró la mayor velocidad de remoción de carbono orgánico disuelto)

### Datos y reporte

Los datos obtenidos deberán ser organizados en una hoja de datos.

El porcentaje de degradación ( $D_t$ ) correspondiente a cada tiempo de muestreo, puede ser obtenido a través las determinaciones por duplicado de COD en cada matraz con sustancia de prueba y registrando el valor promedio para verificar la validez de la prueba. El cálculo es realizado aplicando la siguiente ecuación:

$$D_t = \frac{1 - C_t - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \times 100$$

donde:

- $D_t$  = % de degradación al tiempo t,
- $C_0$  = concentración inicial promedio de COD en el medio de cultivo inoculado conteniendo la sustancia de prueba (mg COD/L),
- $C_t$  = concentración promedio de COD en el medio de cultivo inoculado conteniendo la sustancia de prueba al tiempo t (mg COD/L),
- $C_{bl(0)}$  = concentración inicial promedio de COD en el blanco inoculado en el medio mineral (mg COD/L),
- $C_{bl(t)}$  = concentración promedio en el blanco inoculado en el medio mineral al tiempo t (mg COD/L).

Todas las concentraciones son determinadas experimentalmente. Si la prueba ha cumplido con los criterios de validez, construir una gráfica para seguir el curso de las biodegradación, utilizando los valores promedio los matraces con la sustancia de prueba. Calcular y reportar el porcentaje de remoción alcanzado en la meseta, al final de la prueba y/o en el periodo de diez días según sea apropiado.

Cuando estén disponibles datos de análisis químicos específicos, calcular la biodegradabilidad primaria. Para ello aplicar la siguiente fórmula:

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

donde:

- $D_t$  = % de degradación primaria al tiempo  $t$ , normalmente 28 días,
- $S_a$  = Cantidad residual de la sustancia química en el medio incubado al final de la prueba (mg),
- $S_b$  = Cantidad residual de la sustancia química en el control de degradación abiótico al final de la prueba (mg).

Cuando se incluye un control de degradación abiótico estéril, calcular el porcentaje de degradación abiótica a partir de:

$$\% \text{ de degradación abiótica} = \frac{C_{s(0)} - C_{s(t)}}{C_{s(0)}} \times 100$$

donde:

- $C_{s(0)}$  = Concentración de COD en el control estéril al día cero,
- $C_{s(t)}$  = Concentración de COD en el control estéril al día  $t$ .

### Validez de la prueba

La prueba se considera como válida si la diferencia de los valores por duplicado de remoción de la sustancia química en la meseta, al final de la prueba o durante el periodo de 10 días es menor que 20% y si el porcentaje de degradación del compuesto de referencia ha alcanzado el nivel de



aprobación a los 14 días. Si cualquiera de estas condiciones no es alcanzada, la prueba debe ser repetida. Debido a lo estricto de los métodos, los valores bajos no necesariamente significan que la sustancia de prueba no sea biodegradable a condiciones ambientales, pero indica que se requerirán otras determinaciones para establecer la biodegradabilidad de la misma.

Si en el control de toxicidad, que contiene la sustancia de prueba y el compuesto de referencia, se alcanza menos de 35% de degradación cuantificada como disminución de COD en 14 días, se puede considerar que la sustancia de prueba presenta un efecto inhibitorio. La corrida deberá ser repetida, utilizando concentraciones más bajas de la sustancia de prueba (si esto no afecta la precisión en la determinación de COD) y/o una mayor concentración de inóculo, pero no mayor de 30 mg sólidos/L.

- **Tiempo lag:** En casi todas las curvas de degradación puede ser observado. Se define normalmente como el tiempo desde la inoculación hasta que el porcentaje de degradación ha alcanzado al menos un 10% de remoción del contenido inicial de COD. El tiempo lag es altamente variable y poco reproducible. Se expresa en días.
- **Fase de degradación:** Se define como el intervalo de tiempo entre el final de la fase lag hasta que se alcanza aproximadamente un 90% de nivel máximo de degradación. Se expresa en días.
- **Período de 10 días:** Los 10 días posteriores a que se ha alcanzado un 10% de degradación

#### **Anexo A.2 Calidad del agua — Evaluación en medio acuoso de la biodegradabilidad aerobia última de compuestos orgánicos — Método por análisis de carbono orgánico disuelto ISO 7827:1994 (E)**

**Cuidado:** Precauciones. Los lodos activados y aguas residuales pueden contener organismos patógenos. Deben tomarse las precauciones pertinentes para su manejo. Los compuestos tóxicos y aquellos de propiedades desconocidas deben ser manejados con cuidado.

## 1. Alcance

Esta norma internacional especifica un método para la evaluación de la biodegradabilidad “última” de compuestos orgánicos a una concentración específica por microorganismos aerobios. Las condiciones descritas en esta norma internacional no necesariamente corresponden siempre a las condiciones óptimas que permitan que ocurra el máximo grado de biodegradabilidad.

El método es aplicable a compuestos orgánicos que son:

- Solubles a la concentración de prueba utilizada bajo las condiciones de prueba (entre 10 y 40 mgCOD/L)
- No volátiles o que tengan una presión de vapor despreciable bajo las condiciones de prueba
- Que no se adsorban significativamente en vidrio o en lodos activados
- No inhibitorio para los microorganismos a la concentración establecida para la prueba. Los efectos inhibitorios pueden ser determinados como se describe en la sección 8.3 o utilizando cualquier otro método para determinar efectos inhibitorios en bacterias (ejemplo ISO 8192)

## 2 Referencias normativas

El siguiente procedimiento contiene provisiones que a través de su referencia en el texto, constituyen bases de esta norma internacional. Al tiempo de publicación, las ediciones indicadas eran válidas. Todos los estándares son sujetos a revisión y parte de los acuerdos basados en esta norma internacional están encaminados a investigar la posibilidad de aplicar las más recientes ediciones de las normas indicadas posteriormente. Los miembros de IEC e ISO mantienen registros actualizados de normas internacionales válidas.

ISO 8192:1986 Calidad del agua — Prueba de inhibición del consumo de oxígeno por lodos activados

ISO 9439:1990 Calidad del agua — Evaluación en medio acuoso de la biodegradabilidad aerobia última de compuestos orgánicos — Método por análisis de liberación de dióxido de carbono

ISO 8245:1987 Calidad del agua — Guía para la determinación de carbono orgánico total

ISO 9408:1991 Calidad del agua — Evaluación en medio acuoso de la biodegradabilidad aerobia última de compuestos orgánicos — Método por determinación de la demanda de oxígeno en un respirómetro cerrado

ISO 9887:1992 Calidad del agua — Evaluación de la biodegradabilidad aerobia de compuestos orgánicos en medio acuoso — Método de lodo activado semicontinuo (SCAS)

ISO 9888:1991 Calidad del agua — Evaluación de la biodegradabilidad aerobia de compuestos orgánicos en medio acuoso — Método de Zahn-Wellens

### 3. Definiciones

Para los propósitos de esta norma internacional se aplican las siguientes definiciones:

**3.1 Biodegradación “última”:** Nivel de degradación alcanzado cuando el compuesto de prueba es totalmente utilizado por los microorganismos resultado en la producción de dióxido de carbono, agua, sales minerales y nuevos constituyentes celulares microbianos (biomasa).

**3.2 Biodegradación primaria:** El nivel de degradación alcanzado cuando el compuesto de prueba sufre un cambio estructural, distinto a la mineralización, como resultado de la acción microbiana.

**3.3 Concentración de sólidos suspendidos (de lodo activado):** La cantidad de sólidos obtenidos por filtración o centrifugación de un volumen conocido de lodo bajo condiciones específicas y secado a 105°C a peso constante.

### 4. Fundamento

Determinar la biodegradación de compuestos orgánicos por microorganismos aerobios utilizando un medio de prueba. El compuesto orgánico es la única fuente de carbono y energía del medio. La concentración del compuesto utilizada es aquella que permita una concentración de carbono orgánico en el medio de prueba entre 10 y 40 mgCOD/L. Si es necesario pueden utilizarse concentraciones superiores a 40 mgCOD/L.

Determinar el carbono orgánico disuelto (COD) al inicio de la prueba (día cero) y al final de la prueba (día 28 o más si es necesario) y al menos en tres intervalos de tiempo intermedios.

Determinar el porcentaje de remoción de COD en cada uno de estos intervalos. Evaluar la biodegradabilidad de los compuestos utilizados en base a esos datos. Los análisis específicos pueden dar información adicional acerca de la biodegradabilidad primaria.

## 5. Condiciones de prueba

La incubación debe tener lugar en la oscuridad o con luz difusa en un lugar cerrado, mantenido entre los 20°C y 25°C y libre de vapores tóxicos para los microorganismos.

## 6. Reactivos

Utilizar únicamente reactivos de grado analítico reconocido.

**6.1 Agua destilada o desionizada** que contenga menos de 10% de COD inicial introducida por el compuesto evaluado.

## 6.2. Medio de prueba

### 6.2.1 Composición

#### 6.2.1.1 Solución a:

Fosfato monobásico de potasio, $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .....	8.50 g
Fosfato dibásico de potasio, $\text{K}_2\text{HPO}_4$ .....	21.75 g
Fosfato dibásico de sodio dihidratado, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .....	33.40 g
Cloruro de amonio, $\text{NH}_4\text{Cl}$ .....	0.50 g
Agua necesaria para aforar a .....	1000 mL

Nota 1: La correcta composición del medio es corroborada por la medición del valor de pH que debe ser 7.4.

#### 6.2.1.2 Solución b:

Disolver 22.50 g de sulfato de magnesio heptahidratado ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) en 1000 mL de agua.

**6.2.1.3 Solución c:**

Disolver 27.50 g de cloruro de calcio anhidro ( $\text{CaCl}_2$ ) en 1000 mL de agua.

**6.2.1.4 Solución d:**

Disolver 0.25 g de cloruro de hierro (III) hexahidratado ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) en 1000 mL de agua  
Preparar la solución antes de su uso.

Nota 2 : No es necesario preparar esta solución con anticipación si se añade una gota de HCl concentrado o 0.4 g de EDTA por litro.

**6.2.2 Preparación**

Para 1 L de medio mineral añadir a 500 mL de agua aproximadamente:

- 10 mL de solución a
- 1 mL de solución b, c y d

Aforar a 1000 mL con agua.

**7 Equipo**

Asegurarse que el material de vidrio este perfectamente limpio y en particular, libre de materia orgánica o tóxica.

Material común de laboratorio y:

7.1 Analizador con suficiente sensibilidad para las determinaciones de carbono orgánico disuelto (COD)

7.2 Centrífuga

7.3 Agitador para aireación y mezclado

7.4 Potenciómetro

7.5 Matraces erlenmeyer con capacidad apropiada (por ejemplo, 2000 mL)

7.6 Aparato de filtración con membranas adecuadas (diámetro de poro entre 0.2 y 0.45  $\mu\text{m}$ ) con mínima adsorción del compuesto de prueba o liberación de carbono orgánico

## **8 Procedimiento**

### **8.1 Preparación de las soluciones de prueba**

#### **8.1.1 Solución de sustancia de prueba**

Preparar soluciones patrón en agua o en medio de prueba. Diluir una cantidad apropiada de esta solución en el medio de prueba para obtener una concentración final de carbono orgánico disuelto entre 10 y 40 mgCOD/L.

#### **8.1.2 Solución de compuesto de referencia**

Preparar una solución patrón del compuesto de referencia (un compuesto orgánico de biodegradabilidad conocida como acetato de sodio, benzoato de sodio o anilina) de la misma manera que en la sección anterior para obtener una concentración final de carbono orgánico disuelto entre 10 y 40 mgCOD/L.

#### **8.1.3 Solución para evaluar la inhibición**

Si es necesario, preparar una solución en medio mineral que contenga, el compuesto de prueba y de referencia a sus concentraciones respectivas utilizadas en las soluciones anteriormente preparadas.

### **8.2 Preparación del inóculo**

Preparar el inóculo utilizando las siguientes fuentes o una mezcla de ellas, para obtener una población microbiana que ofrezca suficiente actividad biodegradativa.

Nota 3: En ciertas circunstancias, puede ser utilizada la pre-exposición del inóculo, esto debe ser aclarado en los resultados de la prueba (por ejemplo, porcentaje de biodegradación=X%, utilizando inóculo pre-expuesto), el método de pre-exposición debe ser detallado en el reporte

El inóculo pre-expuesto puede ser obtenido a partir de pruebas de biodegradación de laboratorio llevadas a cabo bajo condiciones variadas [ejemplo, prueba de Zahn-Wellens (ISO 9888) o prueba SCAS (ISO 9887)] o de muestras colectadas de lugares con condiciones ambientales relevantes, (por ejemplo, plantas de tratamiento que trabajen con compuestos similares o áreas contaminadas)

Usar una cantidad apropiada de inóculo (ver nota 4).

Nota 4: El "volumen adecuado" significa:

- Suficiente para dar una población que ofrezca suficiente actividad biodegradativa
- Que degrade el compuesto de referencia en el porcentaje estipulado
- Que tenga entre  $10^3$  y  $10^6$  células activas /mL
- Que no provea más del equivalente de 30 mg/L de sólidos suspendidos de lodo activado en la mezcla final

El contenido de COD en el inóculo debe ser menor de 10% del contenido de carbono orgánico soluble introducido por el compuesto de prueba (por ejemplo < 4 mg/L a la concentración de prueba de 40 mg/L). Si es necesario y posible, lavar el inóculo.

### 8.2.1 Inóculo de un efluente secundario

Tomar una muestra de efluente secundario colectado de una planta de tratamiento o de una planta a escala de laboratorio que trate principalmente aguas domésticas. Si es necesario, concentrar la muestra por filtración o centrifugación. Mezclar bien, guardar la muestra bajo condiciones aerobias y utilizar el mismo día de su recolección.

Por ejemplo, preparar el inóculo de la siguiente manera:

- Dejar que la muestra se sedimente por 1 hora,
- Tomar un volumen adecuado de sobrenadante, para ser utilizado como inóculo

### 8.2.2 Inóculo a partir de una planta de lodos activados

Tomar una muestra de lodos activados colectada de un tanque de aereación de una planta de tratamiento o de una planta a escala de laboratorio que trate principalmente aguas domésticas. Mezclar bien, guardar la muestra bajo condiciones aerobias hasta su uso y utilizarla el mismo día de su recolección.

Antes de su uso, determinar la concentración de sólidos suspendidos. Si es necesario, concentrar el lodo por sedimentación, para que así el volumen añadido sea mínimo. Agregar un volumen adecuado para obtener 30 mg/L de sólidos suspendidos en la mezcla final.

### 8.2.3 Inóculo a partir de aguas superficiales

Tomar una muestra de aguas superficiales. Si es necesario, concentrar la muestra por filtración o centrifugación. Guardar la muestra bajo condiciones aerobias y utilizarla el mismo día de su recolección. Tomar un volumen adecuado como inóculo.

### 8.3 Prueba

Preparar un número suficiente de matraces con volumen adecuado (por ejemplo, 2000 mL, aunque pueden utilizarse otros tipos de matraces y volúmenes) para contar con:

- Al menos 2 matraces (testigo=  $M_T$ ) conteniendo 1000 mL de la solución con sustancia de prueba;
- Al menos dos blancos de prueba (blanco=  $M_B$ ) conteniendo 1000 mL de medio mineral;
- Al menos 1 matraz, como control de procedimiento (control=  $M_C$ ) conteniendo 1000 mL de la solución del compuesto de referencia
- Si es necesario, un matraz para evaluar el posible efecto inhibitorio del compuesto de prueba (inhibición=  $M_I$ ) conteniendo 1000 mL de la solución correspondiente
- Si es necesario, un matraz para evaluar la posible degradación abiótica (sin inóculo=  $M_S$ ) conteniendo 1000 mL de la solución con sustancia de referencia pero sin inóculo, esterilizada con 1 mL/L de una solución conteniendo 10g/L de cloruro de mercurio (II) ( $HgCl_2$ ) u otro compuesto inorgánico que prevenga la actividad microbiana. Si van a ser analizadas sustancias de extremadamente fácil biodegradación, se recomienda agregar la misma cantidad de sustancia tóxica dos semanas después de que la prueba haya comenzado (ver notas 5 y 6).

Nota 5: Al comparar el porcentaje de eliminación en los matraces  $F_T$  y  $F_S$ , puede ser determinado si el compuesto de prueba es eliminado o no por mecanismos abióticos (físicoquímicos), como adsorción. Los resultados deben ser incluidos en el reporte de prueba.

Nota 6: Si se utilizan lodos activados como inóculo, el compuesto de prueba puede ser adsorbido significativamente en el lodo. Esto puede ser evaluado utilizando la prueba tal y como se describe para el matraz



$M_S$ , pero con adición del inóculo. Normalmente, sólo pueden analizarse compuesto puros o casi puros, cuando se tiene una mezcla, puede ocurrir adsorción selectiva de los distintos componentes.

Inocular los matraces  $M_T$ ,  $M_B$ ,  $M_C$  y  $M_I$  con un volumen apropiado de inóculo) y mezclar el contenido de los matraces (ver nota 4). Generalmente 1-10 mL de inóculo son suficientes para 1000 mL de solución de prueba.

Durante la prueba, mantener los matraces en agitación a temperatura entre 20°C y 25°C.

Para compensar la pérdida de agua por evaporación, constatar el volumen de medio antes de tomar muestras y, si es necesario, completarlo con agua al volumen o masa medido después del muestreo anterior.

Al inicio de la prueba (día cero), al final de la prueba (normalmente 28 días) y al menos a tres intervalos intermedios (ejemplo, 7, 14 y 21 días), tomar un volumen mínimo de los matraces  $M_T$ ,  $M_B$ ,  $M_C$  y  $M_I$ . Si es necesario tomar muestras en intervalos de tiempo menores o prolongar el tiempo por más de 28 días. Al inicio y al final de la prueba, tomar una muestra del matraz  $F_S$ . Si se incluyó un matraz  $M_S$  inoculado (ver notas 6 y 7), tomar una muestra al día cero y 1. Filtrar a través de filtro de membrana, o si el material puede adsorberse a las membranas, centrifugar a 40000  $m/s^2$  por 15 minutos.

Determinar la concentración de COD al menos por duplicado en cada periodo de tiempo en cada matraz. Para información adicional de degradación primaria, pueden realizarse análisis específicos. La concentración medida en el medio de prueba al inicio de la prueba (día cero), es la concentración inicial utilizada para los cálculos.

Si se alcanza un porcentaje de remoción de carbono orgánico suficiente (>70%) y un nivel constante de degradación es obtenido antes de los 28 días considerar que la prueba ha terminado. Extender la prueba por 1 o 2 semanas, si la degradación no ha comenzado o no se ha alcanzado la meseta. Cuando las determinaciones de carbono orgánico disuelto tienen que

ser pospuestas hasta por 48 horas, guardar las muestras a 4°C en la oscuridad y en matraces cerrados. Si las muestras tienen que ser guardadas por más de 48 horas, conservarlas a -18°C. Alternativamente, añadir una sustancia inorgánica adecuada, por ejemplo 20 mL/L de una solución conteniendo 10g/L de cloruro de mercurio (II) (HgCl<sub>2</sub>), para prevenir la actividad microbiana y guardar a 4°C.

## 9 Cálculos y expresión de resultados

### 9.1 Cálculos

Para cada matraz, determinar el porcentaje de eliminación de carbono orgánico disuelto D<sub>t</sub> utilizando la ecuación:

$$D_t = \frac{(1 - \varepsilon_t - \varepsilon_{Bt})}{\varepsilon_0 - \varepsilon_{B0}} \times 100$$

donde:

$\varepsilon_0$  = Concentración promedio de COD en mg/L, al tiempo cero, en cada matraz M<sub>T</sub>

$\varepsilon_{B0}$  = Concentración promedio de COD en mg/L, al tiempo cero, en el matraz blanco M<sub>B</sub>

$\varepsilon_t$  = Concentración promedio de COD en mg/L, al tiempo t en cada matraz M<sub>T</sub>

$\varepsilon_{Bt}$  = Concentración promedio de COD en mg/L, al tiempo t en cada matraz blanco M<sub>B</sub>

Redondear el porcentaje al número entero más cercano.

Nota 7: La eliminación abiótica (matraz M<sub>S</sub>) puede ser calculada con la misma ecuación, pero sin considerar los valores del blanco (si se incluyó un matraz M<sub>S</sub> inoculado, si hay que considerarlos). Una pérdida significativa de carbono orgánico, no permite diferenciar entre degradación biótica o abiótica. En este caso otras pruebas basadas en parámetros que consideran claramente procesos biológicos deben ser realizadas, como la prueba respirométrica (ISO 9408) o la prueba de producción de dióxido de carbono (ISO 9439).

Nota 8: El grado de eliminación de la mezcla del compuesto de prueba y sustancia de referencia en el control de inhibición (matraz F<sub>1</sub>) puede ser calculado con la misma ecuación. Si el porcentaje de eliminación de la mezcla es menor del 34% en 14 días, el compuesto de prueba inhibe la biodegradación de la sustancia de referencia y por lo tanto, se asume que es tóxico. En este caso, la prueba debe ser repetida con una concentración menor de compuesto de prueba o con un inóculo pre-expuesto.

## 9.2 Expresión de resultados

Compilar en una tabla el porcentaje de eliminación de COD por cada intervalo y cada matraz. Si son obtenidos resultados comparables en los matraces que se encuentran por duplicado, construir la curva de eliminación en función del tiempo.

Algunos parámetros de degradación el tiempo lag, el tiempo de degradación y el máximo nivel de degradación pueden ser determinados a partir de esta curva; en particular, si hay muchos datos disponibles. Si la sustancia de prueba no es abióticamente eliminada de forma significativa (por ejemplo, por adsorción) y la curva de eliminación tiene una forma típica con una fase lag y una fase de degradación, asignar el valor de eliminación de COD medido a porcentaje de degradación.

### 9.2.1. Tiempo lag $t_1$

En casi todas las curvas de degradación puede ser observado. Se define normalmente como el tiempo desde la inoculación hasta que el porcentaje de degradación ha alcanzado al menos un 10% de remoción del contenido inicial de COD. El tiempo lag es altamente variable y poco reproducible. Se expresa en días.

### 9.2.2 Nivel máximo de degradación

El nivel máximo de degradación se define como el nivel aproximado por encima del cual no ocurrirá más degradación en la prueba

### 9.2.3 Tiempo de degradación $t_2$

Se define como el intervalo de tiempo entre el final de la fase lag hasta que se alcanza aproximadamente un 90% de nivel máximo de degradación. Se expresa en días.

## 10 Validez de la prueba

10.1 Considerar la prueba válida si, en los matraces con la misma concentración de prueba e inóculo, la diferencia entre los porcentajes de remoción de COD son menores del 20% al final de la prueba. Si este no es el caso, repetir la prueba.

**10.2** Considerar los resultados de la prueba válidos si, en el matraz que contiene el compuesto de referencia, el porcentaje de degradación después del día 14 es mayor del 70%. Si este no es el caso, repetir la prueba.

### **11 Reporte de la prueba**

El reporte debe incluir al menos la siguiente información:

- La referencia a esta norma internacional;
- Toda la información necesaria para la identificación del compuesto de prueba;
- Todos los datos obtenidos (por ejemplo en forma tabular) y la curva de degradación;
- La concentración de la sustancia de prueba utilizada y el contenido de COD a esta concentración;
- El nombre de la sustancia de referencia utilizada y el porcentaje de degradación obtenido con ésta;
- La fuente, características, concentración o volumen de inóculo utilizado, así como cualquier pretratamiento;
- Principales características del método de análisis de COD;
- Temperatura de incubación en la prueba;
- Porcentaje de degradación obtenido en el matraz  $M_s$  (monitoreo de degradación abiótica);
- Porcentaje de degradación en el matraz  $M_1$  (toxicidad) y discusión acerca de la toxicidad de la sustancia de prueba;
- Razones de rechazo, en caso de existir;
- Cualquier modificación al procedimiento estándar o circunstancia que pudiera afectar los resultados obtenidos.

## ANEXO B. GUÍA PARA LA OPERACIÓN DEL RESPIRÓMETRO AUTOMÁTICO VOITH - SAPROMAT B-12

(Manual de respirómetro automático VOITH-Sapromat B-12, 1996)

### Fundamento

El método respirométrico presenta la particularidad de que el oxígeno se encuentra disponible a lo largo de toda la prueba. Esto se logra por medio del montaje de unidades compuestas por un indicador de presión, un generador de oxígeno (celda electrolítica) y un matraz de reacción interconectados por mangueras (Fig. 28). Los envases forman un sistema de medición sellado por lo que las fluctuaciones de la presión barométrica no afectan el resultado de las determinaciones.

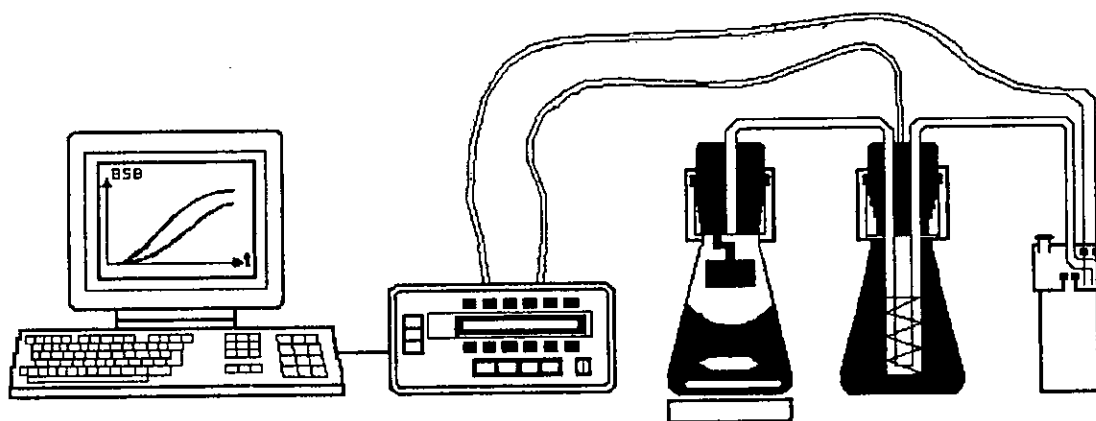


Figura 28. Esquema de los componentes básicos del respirómetro VOITH-Sapromat B-12

La actividad de los microorganismos en la muestra produce  $\text{CO}_2$ . La absorción del  $\text{CO}_2$  en gránulos de cal sodada crea un vacío parcial en la unidad de medición, el cual es registrado por el indicador de presión; este controla la generación electroquímica de oxígeno a partir de una solución ácida saturada de  $\text{CuSO}_4$ , que será suministrado al matraz de reacción. La relación nitrógeno/oxígeno en el espacio gaseoso sobre la muestra se mantiene a través del periodo de medición, por lo tanto no existe disminución en la concentración de oxígeno disuelto. Un

agitador magnético dentro de la muestra provee de agitación vigorosa, con el fin de asegurar un intercambio de gases efectivo. La temperatura de la muestra se mantiene por medio de un baño de agua controlado. En contraste con el método de dilución convencional, este equipo permite que se lleve a cabo un verdadero proceso respiratorio pues cuantifica la cantidad de oxígeno utilizado por los microorganismos para llevar a cabo la oxidación bioquímica de compuestos orgánicos.

### Descripción del equipo VOITH-Sapromat B-12

#### Componentes del respirómetro VOITH-Sapromat B-12

El equipo consta de:

- Baño de agua con temperatura controlada.
- 12 unidades de reacción integradas cada una de ellas por una unidad de reacción con dispositivo de absorción de  $\text{CO}_2$  a base de cal de sodio colocada en un recipiente acoplado al tapón y de un agitador magnético ubicado al fondo del matraz.
- Un indicador de presión.
- Un generador electrolítico de oxígeno.

**Nota:** Estos aditamentos se encuentran interconectados por mangueras y electrodos.

- Unidad de registro de valores con indicador digital (Fig. 29). En ella se encuentran los siguientes botones:
  1. **START:** Inicia la medición de valores.
  2. **STOP:** Interrumpe o termina la medición de valores.
  3. **RESET:** Borra los valores producto de la medición.
  4. Botones de factor: Presentan el valor del factor de oxígeno en las unidades de reacción activas.
  5. Botones de valor de DBO: Despliegan los valores de DBO registrados en las unidades de reacción activas.
  6. Botones de selección de factor: Permiten ajustar el valor del factor de oxígeno de las unidades de reacción al valor deseado. El factor de medición óptimo es:
    - Factor de 0.1:  $\text{DBO}_5$  en el intervalo de 0 a 600  $\text{mgO}_2/\text{L}$

- Factor de 0.5:  $\text{DBO}_5$  en el intervalo de 0 a 3000  $\text{mgO}_2/\text{L}$
  - Factor de 1.0:  $\text{DBO}_5$  en el intervalo de 0 a 6000  $\text{mgO}_2/\text{L}$
  - Factor de 2.0:  $\text{DBO}_5$  en el intervalo de 0 a 12000  $\text{mgO}_2/\text{L}$
7. Botones de unidad individual: Presentan un diodo de operación (verde) y un diodo de suministro de oxígeno (rojo) que sirven para poner en operación cada unidad por separado.
  8. Botón de operación para todas las unidades: Permite poner en funcionamiento todas las celdas a la vez.
  9. Llave: Protege el panel de operación contra el acceso no autorizado:
    - Vertical: No es posible el acceso al panel de operación
    - Horizontal: Es posible acceder al panel de operación y todos sus elementos
  10. Área de exposición: Muestra las funciones realizadas en un momento dado, por ejemplo los valores registrados de DBO o mensajes de error.
- Una computadora donde se lleva a cabo el registro de valores, pruebas, condiciones etcétera, así como la construcción automática de las gráficas correspondientes al proceso.
  - Unidad de enfriamiento.

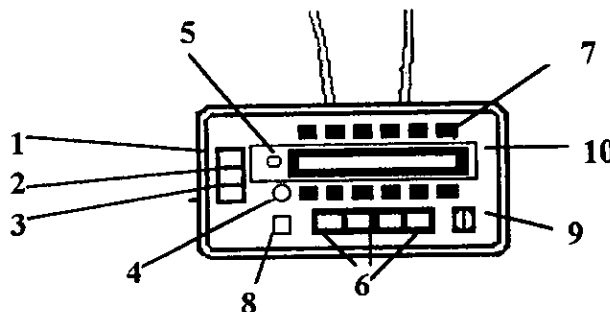


Figura 29. Esquema de la pantalla de control

### Obtención de resultados

La cantidad de la muestra, el amperaje para que se lleve a cabo la generación electroquímica de oxígeno y la sincronización de la velocidad del motor están establecidos para que con 250 mL de muestra el contador digital indique la DBO en  $\text{mgO}_2/\text{L}$ .

En el caso de valores muy altos de DBO:

- Se puede aplicar *RESET* al llegar al límite de detección y después sumar el valor restante obtenido.
- Si la DQO indica la posibilidad de obtener una DBO mayor de 1000 mg O<sub>2</sub> / L se puede disminuir el volumen de la muestra al 50% (125 mL ), sin necesidad de diluir la muestra y una vez terminada la evaluación el valor que aparece en el indicador digital se multiplica por 2. También es posible realizar una dilución, en cuyo caso deberá multiplicarse por el factor de dilución (f) correspondiente. El factor de dilución se obtiene a partir del inverso de la dilución. Ejemplo:

dilución 1/10, inverso 10/1, por lo tanto  $f=10$

### Observaciones

Al adicionar agua se diluye la concentración de materia orgánica disuelta y también las sustancias tóxicas contenidas en la muestra, por lo que pueden obtenerse resultados difíciles de extrapolar a las condiciones del ambiente real del que proviene la muestra a analizar.

### Aplicaciones

- Obtención de la DBO por el método respirométrico
- Pruebas a sustancias sólidas (Ejemplo: suelos)
- Pruebas de descomposición de sustancias químicas
- Análisis de productos de interés
- Realización de pruebas de biodegradabilidad aerobia

Además de las mediciones de rutina, también es posible realizar la medición de valores de DBO muy bajos. El comportamiento de degradación de la muestra puede ser observado a través del tiempo.



## Reactivos requeridos y pasos previos al montaje de la prueba

### a) Preparación de las celdas electrolíticas

Solución compuesta de 2050 g de sulfato de cobre pentahidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) en 7.5 L de agua destilada. Agregar 200 mL de ácido sulfúrico concentrado ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ). Llenar con esta solución los matraces generadores de oxígeno (Fig. 30).

1. Quitar el tapón junto con el cátodo de cobre y el cilindro de vidrio.
2. Llenar el matraz Erlenmeyer con la solución de sulfato de cobre hasta aproximadamente 5 cm del cuello del matraz.
3. Insertar el tapón en el matraz lleno y cerrar perfectamente.
4. Introducir las 2 mangueras en las conexiones correspondientes.
5. Girar el tubo de plexiglás 4 o 5 veces.
6. Usar una jeringa para llenar con solución de sulfato de cobre a través de una de las mangueras hasta que el nivel de solución en el tubo de plexiglás alcance 1 cm. sobre el borde del tapón. Agitar para permitir el escape del aire atrapado.
7. Regresar el tubo de plexiglás a su posición original.
8. Permitir el flujo de la solución de sulfato de cobre fuera del cilindro de vidrio y llenarlo por medio de la manguera con solución de ácido sulfúrico al 5% hasta que el electrodo de platino esté completamente inmerso.

### b) Preparación de los indicadores de presión

Elaborar una solución de ácido sulfúrico al 0.5% mezclado con una solución de anaranjado de metilo como indicador de pH para controlar el nivel existente con mayor facilidad. Para incorporar el volumen correspondiente a cada indicador de presión (Fig. 30).

1. Abrir la válvula de rosca.
2. Llenar con solución de ácido sulfúrico al 0.5% y unas gotas de anaranjado de metilo hasta que el electrodo de platino corto quede inmerso de 2 - 3 mm.
3. Cerrar la válvula de rosca.

Colocar los generadores de oxígeno y los indicadores de presión dentro del baño de agua previamente llenado con 60 L de agua desmineralizada. Conectar los electrodos negros a los indicadores de presión (Fig. 30).

1. Tapón
2. Matraz erlenmeyer
3. Cátodo de cobre
4. Solución de sulfato de cobre
5. Tubo de Plexiglass
6. Cilindro de vidrio
7. Ácido sulfúrico al 5%
8. Anódo de platino
9. Conexión de mangueras
10. Conexión de electrodos
11. Válvula

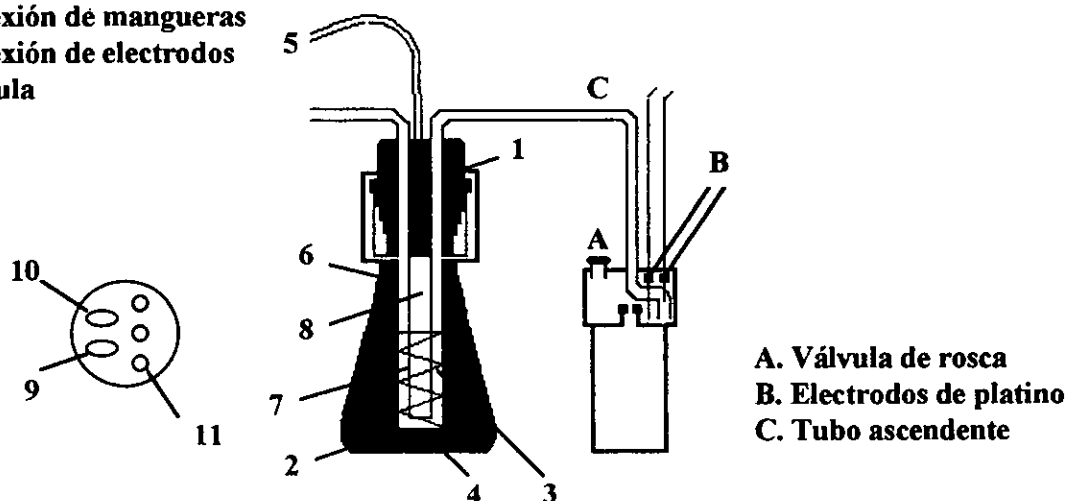


Figura 30. Esquema del matraz generador de oxígeno y del indicador de presión

#### Procedimiento de montaje de la prueba en muestras líquidas

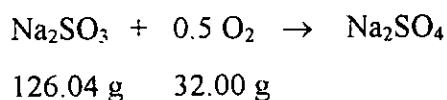
1. Centrifugar las muestras de agua que se deseen analizar, a fin de eliminar partículas suspendidas. Esta operación se realiza sólo en caso de requerir evaluar el consumo de oxígeno por materia orgánica disuelta biodegradable.
2. Encender el baño de agua con 30 minutos de anticipación para el calentamiento del sistema.
3. Depositar en el vaso de reacción la muestra a ser analizada (realizar diluciones pertinentes y ajuste de pH a valores cercanos a la neutralidad). El volumen total es de 250

- mL. Introducir una barra de agitación y un volumen predefinido de inóculo microbiano (aproximadamente el 10% del volumen total de la muestra).
4. Colocar en el tapón del vaso de reacción cal de sodio granulada para captar el  $\text{CO}_2$  producido durante el metabolismo microbiano aerobio. La cal de sodio debe ser secada previamente a  $103^\circ\text{C}$  durante una hora y enfriada posteriormente en un desecador.
  5. Cerrar correctamente el tapón de rosca del vaso de reacción, cuidando de que no caiga cal de sodio a la muestra de agua en estudio.
  6. Encender el sistema de registro y realizar las anotaciones pertinentes en el control del graficador directo (fecha, hora de inicio de la prueba, procedencia de la muestra, diluciones, etc).
  7. Ajustar los indicadores digitales a cero y activar el sistema (Fig. 29):
    - Presionar simultáneamente **RESET** y los botones correspondientes a las celdas activas
    - Presionar simultáneamente **START** y los botones correspondientes a las celdas activas
  8. Introducir el vaso de reacción en el baño de agua.
  9. Realizar las interconexiones necesarias de mangueras y electrodos de los diferentes componentes de las 12 unidades de medición (Fig. 30). Conectar los electrodos rojo y azul al matraz generador de oxígeno.
  10. Encender el mecanismo de agitación.
  11. Ajustar el indicador de presión (cerrar y observar que todos se encuentren al mismo nivel para evitar valores erróneos, en caso de no ser el mismo nivel desconectar la manguera del matraz generador de  $\text{O}_2$ , abrir la válvula de rosca del indicador de presión y reintentar).
  12. Registrar los valores obtenidos después de finalizar el tiempo del experimento, observar las gráficas (pueden hacerse registros manuales en una bitácora de control si es que se desea conocer algún valor en un tiempo determinado).
  13. Al finalizar la prueba de consumo de oxígeno ( $\text{DBO}_5$ ,  $\text{DBO}_u$ , etc.):
    - Presionar **STOP** y los botones correspondientes a las celdas activas
    - Presionar **RESET** y los botones correspondientes a las celdas activas

14. Apagar el equipo, abrir la válvula de rosca localizado en el indicador de presión; desconectar la manguera de los vasos de reacción y de manera parcial los electrodos.
15. Retirar las muestras y lavar con jabón especial para cristalería de laboratorio o con agua corriente. Finalmente enjuagar con agua destilada y dejar secar.

### **B.1. Calibración del equipo VOITH-Sapromat B-12 con sulfito de sodio**

De acuerdo con las instrucciones del fabricante, para la calibración y/o verificación del buen funcionamiento del equipo VOITH-Sapromat B-12 se puede utilizar el método de oxidación de sulfito de sodio a sulfato de sodio. Se lleva a cabo un consumo definido de oxígeno, de acuerdo con la estequiometría de la reacción:



El sulfito de sodio es secado durante 15 minutos a 105°C para evitar la obtención de resultados erróneos. Se prepara una solución conteniendo 393.875 mg de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> por cada 250 mL de solución amortiguadora de fosfatos (HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>/PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) 0.1 M a pH 7.0. Esta cantidad corresponde a un consumo de 50 mg de oxígeno. Se monta el sistema y se mantiene en operación durante aproximadamente 12 horas, tiempo en que se lleva a cabo la reacción. Al pasar este tiempo el Sapromat debe marcar aproximadamente 200 unidades. Para determinar la concentración de la solución puede utilizarse una técnica volumétrica con tiosulfato de sodio (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) 0.025 M y yoduro de potasio (KI). Se titula el yodo liberado con el tiosulfato, añadiendo almidón como indicador. La solución se titula hasta color paja pálido, se añaden unas gotas de solución de almidón para continuar valorando hasta la primera desaparición del color azul. La desviación aceptable de los valores es de 200 +/- 4%.

### **Interferencias**

Las películas de plástico utilizadas con los sistemas de electrodo de membrana son permeables a una serie de gases, además de oxígeno, aunque ninguno se despolariza fácilmente en el electrodo indicador. El uso prolongado de electrodos de membrana en aguas que contengan gases como el sulfuro de hidrógeno tiende a reducir la sensibilidad.

### **Procedimiento**

1. Conectar el electrodo.
2. El switch del electrodo debe estar el OFF.
3. Girar el switch del electrodo hacia BTCK, la correcta operación de la batería es indicada por una lectura de 13.40 o más en el medidor.
4. Gire el switch del electrodo hacia la posición de ZERO. Use el control de calibración izquierdo hasta calibrar en 0.00.
5. Gire el switch del electrodo hasta la posición de MEASURE para el análisis de la muestra.
6. Coloque el embudo en el frasco de DBO que contenga la muestra y sumerja lentamente el electrodo.
7. La lectura es en ppm de oxígeno molecular disuelto.
8. Inmediatamente remueva el electrodo de la muestra, enjuague y seque la membrana, colocar en su contenedor.

### **Anexo D.4. Determinación de sólidos (APHA, 1992)**

#### **a) Sólidos totales secados a 103-105°C**

##### **Fundamento**

Se evapora una muestra correctamente mezclada en una cápsula de porcelana pesada y secada a peso constante en un horno a 103-105°C. El aumento de peso con respecto a la cápsula vacía representa los sólidos totales.

**Interferencias**

Aguas con altas concentraciones de calcio, magnesio, cloruros o sulfatos pueden requerir un tiempo de secado alto, ya que son higroscópicas. Es recomendable utilizar muestras poco abundantes para obtener residuos pequeños. Eliminar grandes agregados de material no homogéneo si se decide que no es deseable su consideración en el resultado final de la prueba.

**b) Sólidos fijos y volátiles incinerados a 550°C****Fundamento**

El residuo obtenido del procedimiento anterior se incinera a peso constante a 550°C. Los sólidos remanentes representan los sólidos totales fijos, disueltos o en suspensión, mientras que la pérdida de peso por ignición representa los sólidos volátiles. Esta determinación ofrece un cálculo aproximado de la cantidad de materia orgánica presente en la fracción sólida del agua residual, debido a que no se puede distinguir exactamente si son sustancias orgánicas o inorgánicas las que provocan la pérdida de peso por ignición, ya que esta no se limita a material orgánico sino que incluye pérdida por descomposición o volatilización de algunas sales minerales

**Interferencias**

Pérdida de materia evaporable durante el secado, baja concentración de sólidos volátiles en presencia de altas concentraciones de sólidos fijos.

**Material**

- Cápsulas de porcelana
- Horno de secado a 103-105°C
- Horno de mufla a 550 ± 50°C
- Desecador
- Pinzas de crisol
- Balanza analítica capaz de pesar hasta 0.1 mg

**Procedimiento**

1. Lavar cápsulas de porcelana y secarlas.
2. Introducir cápsulas en la estufa a 105°C durante 2 horas o en la mufla a 300°C durante 30 minutos.
3. Sacar las cápsulas y conservarlas en el desecador. Dejar enfriar aproximadamente 40 minutos.
4. Pesar las cápsulas en la balanza analítica. Comprobar que se encuentran a peso constante (Peso A)
5. Agregar 5 o 10 mL de la muestra.
6. Meter en la estufa a 103-105°C durante 1 o 2 horas dependiendo de la cantidad de muestra.
7. Sacar las cápsulas y conservar en el desecador. Enfriar 40 minutos aproximadamente.
8. Pesar en balanza analítica (Peso B). Repetir el ciclo de secado, enfriado, desecación y pesado hasta obtener un peso constante o hasta que la pérdida de peso sea menor al 4% o menor de 0.5 mg
9. Introducir las cápsulas en la mufla a 550°C durante 25-30 minutos.
10. Sacar cápsulas y conservarlas en el desecador. Enfriar aproximadamente 40 minutos.
11. Pesar en balanza analítica. Repetir el ciclo de incineración, enfriado, desecación y pesado hasta obtener un peso constante o que la pérdida de peso sea menor del 4% del peso previo (Peso C).

**Cálculos**

$$\text{Sólidos totales (STT)} = \frac{(B-A) \times 1 \times 10^6}{5 \text{ mL}} = \text{mg/L}$$

$$\text{Sólidos totales volátiles (STV)} = \frac{(B-C) \times 1 \times 10^6}{5 \text{ mL}} = \text{mg/L}$$

$$\text{Sólidos totales fijos (STF)} = \frac{(C-A) \times 1 \times 10^6}{5 \text{ mL}} = \text{mg/L}$$

Peso A: Peso de la cápsula, Peso B: Peso de la cápsula + residuo seco, Peso C: Peso de la cápsula + residuo calcinado

## ANEXO C. TABLAS DE LOS VALORES REGISTRADOS DE LA APLICACIÓN DE LAS PRUEBAS

Tabla 24. Etapa experimental previa. Valores de consumo de oxígeno (mg/L) durante la aplicación de la prueba de biodegradabilidad aerobia rápida

Matraz/Días	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Matraz # 1	0	393	763	926	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Matraz # 2	0	372	767	1105	1428	1735	2036	2203	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Matraz # 3	0	436	923	1269	1585	1707	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Matraz # 4	0	381	775	1041	1286	1533	1783	2030	2287	2502	2731	2952	3161	3362	3573	3781	3879	-----	-----	-----	-----	-----
Matraz # 5	0	375	743	988	1218	1451	1688	1923	2153	2383	2610	2834	3049	3252	3455	3663	3854	4034	4214	4401	4681	4706
Matraz # 6	0	376	757	1019	1256	1497	1737	1974	2206	2440	2672	2895	3101	3306	3515	3726	3923	4198	4383	4472	4608	4791
Matraz # 7	0	389	768	1031	1268	1505	1743	1976	2201	2421	2634	2838	3036	3226	3415	3597	3779	3944	4100	4262	4425	4572
Matraz # 8	0	374	760	1048	1317	1579	1834	2090	2344	2593	2839	3073	3294	3523	3687	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Matraz # 9	0	370	740	990	1216	1445	1679	1912	2141	2365	2581	2787	2979	3166	3372	3581	3749	3879	4045	4220	4338	4412
Matraz # 10	0	421	812	1097	1366	1633	1899	2161	2416	2666	2906	3122	3263	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Matraz # 11	0	388	774	1035	1272	1512	1752	1990	2227	2466	2696	2926	3135	3337	3524	3730	3931	4098	4259	4445	4606	4660
Matraz # 12	0	1	1	1	1	2	2	3	4	4	5	5	6	10	10	10	10	19	26	26	26	26

Nota 1: Datos de consumo de oxígeno en mg/L obtenidos cada 24 horas durante los 42 días de incubación a 20°C. Los ---- significan que el matraz fue retirado para la determinación de los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos de interés para la prueba. El matraz #12 fue un control con agua destilada, por lo que los valores de consumo de oxígeno registrados en este matraz servirán posteriormente para ajustar los valores de consumo de oxígeno en los matraces con dilución de agua residual.

Nota 2: El criterio aplicado para retirar un matraz del equipo fue:

- Aquel que se alejaba del valor de la media
- Aquel que mostraba un comportamiento distinto al resto de los matraces en operación (mayor o menor consumo de oxígeno) entre los tiempos de muestreo establecidos

Nota 3: Los valores de consumo de oxígeno registrados en los matraces 1-11 se presentan ya ajustados en esta tabla.



**Continuación Tabla 24. Etapa experimental previa. Valores de consumo de oxígeno (mg/L) durante la aplicación de la prueba de biodegradabilidad aerobia rápida**

Matraz/Días	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	
Matraz # 1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Matraz # 2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Matraz # 3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Matraz # 4	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Matraz # 5	4882	4831	4870	4906	4936	4965	5217	5633	5892	6124	6356	6692	6828	7061	7291	7406	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Matraz # 6	4754	4800	4839	4972	4899	4927	5191	5604	5983	6123	6364	6552	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Matraz # 7	4774	4741	4887	4830	4864	4805	5156	5680	5861	6102	6338	6676	6812	7040	7262	7578	7685	7880	8070	8262	8354	-----
Matraz # 8	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Matraz # 9	4460	4497	4528	4553	4607	4637	4848	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Matraz # 10	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Matraz # 11	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Matraz # 12	28	30	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	38	42	42	42	42

**Nota 1:** Datos de consumo de oxígeno en mg/L obtenidos cada 24 horas durante los 42 días de incubación a 20°C. Los ---- significan que el matraz fue retirado para la determinación de los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos de interés para la prueba. El matraz #12 fue control un con agua destilada, por lo que los valores de consumo de oxígeno registrados en este matraz posteriormente servirán para ajustar los valores de consumo de oxígeno en los matraces con dilución de agua residual.

**Nota 2:** El criterio aplicado para retirar un matraz del equipo fue:

- Aquel que se alejaba del valor de la media
- Aquel que mostraba un comportamiento distinto al resto de los matraces en operación (mayor o menor consumo de oxígeno) entre los tiempos de muestreo establecidos

**Nota 3:** Los valores de consumo de oxígeno registrados en los matraces 1-11 se presentan ya ajustados en esta tabla.

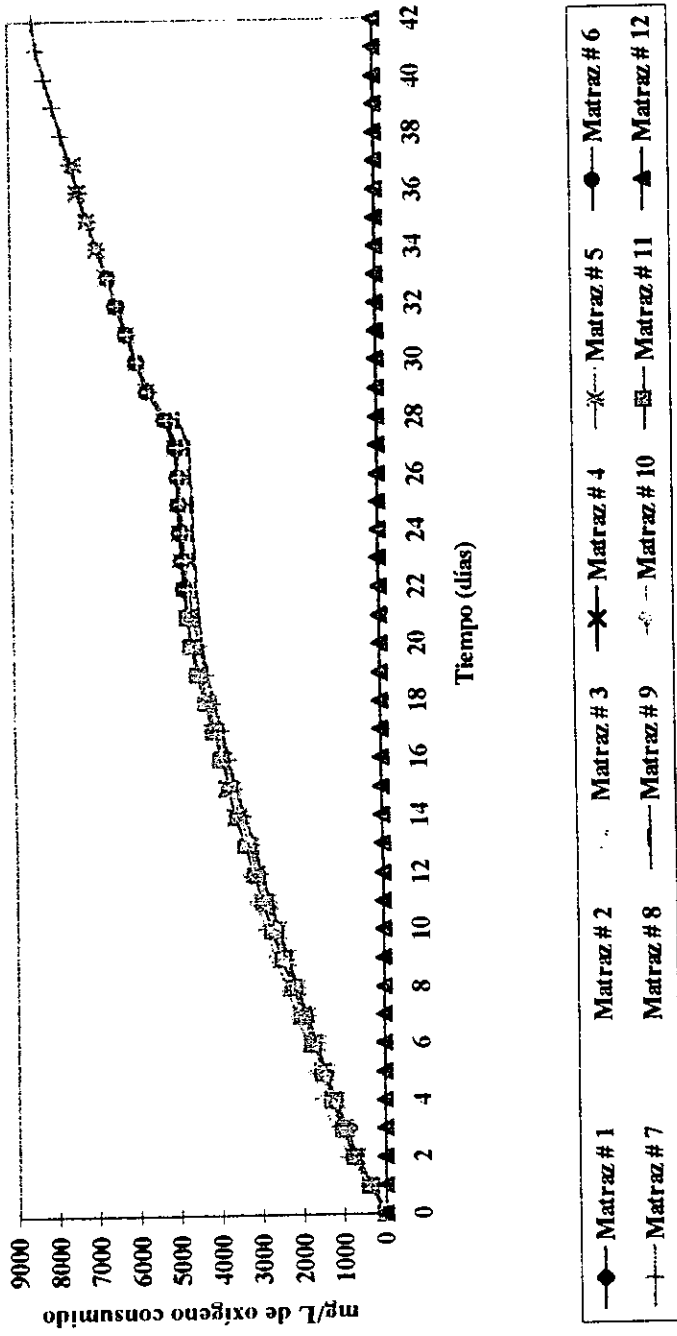


Figura 31. Etapa experimental previa. Perfil de comportamiento de los diferentes matraces empleados durante la aplicación de la prueba de biodegradabilidad aerobia rápida

Nota: Se aprecian dos etapas del proceso de biodegradación, la primera por degradación de materia orgánica carbonosa que tiende a llegar a una meseta alrededor del día 22 y la etapa de nitrificación después de 28 días de incubación

**Tabla 25. Relación de matraces empleados y consumo de oxígeno (mg/L) de las muestras sometidas a la prueba OECD 301-A modificada**

Muestra/Días	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Control procedimiento	0	41	55	58	58	62	72	73	75	78	85	95	97	98	98
Control de adsorción	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sustancia de prueba	0	16	22	31	52	65	78	89	---	---	---	---	---	---	---
Sustancia de prueba	0	14	31	53	61	64	73	77	78	80	85	90	91	93	95
Control de degradación abiótica	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sustancia de prueba	0	18	30	40	51	53	58	61	61	61	65	72	78	79	79
Sustancia de prueba	0	19	38	42	53	64	77	87	94	98	100	100	101	102	103
Control inóculo	0	6	6	14	18	18	23	25	25	25	28	33	44	47	47
Control inóculo	0	4	14	22	31	33	38	45	---	---	---	---	---	---	---
Control inóculo	0	48	57	68	71	72	78	80	80	84	93	105	107	110	111
Control de toxicidad	0	17	29	42	48	51	56	59	59	60	61	65	69	69	71
Control inóculo	0	64	75	79	82	84	92	93	96	102	110	122	131	131	132

Matraz / Días	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
Control procedimiento	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99
Control de adsorción	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sustancia de prueba	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Sustancia de prueba	95	95	95	95	95	95	95	---	---	---	---	---	---	---
Control de degradación abiótica	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sustancia de prueba	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Sustancia de prueba	103	104	104	105	106	107	107	107	107	107	107	107	107	107
Control inóculo	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Control inóculo	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Control inóculo	115	115	115	115	116	122	125	125	125	125	132	132	137	139
Control de toxicidad	71	73	73	74	74	74	75	75	75	75	75	75	75	75
Control inóculo	133	133	133	135	140	142	148	---	---	---	---	---	---	---

**Nota 1:** Datos de consumo de oxígeno en mg/L obtenidos cada 24 horas durante los 28 días de incubación a 22°C. Los --- significan que el matraz fue retirado para la determinación de los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos de interés para la prueba.

**Nota 2:** El criterio aplicado para retirar un matraz del equipo fue:

- Aquel que se alejaba del valor de la media
- Aquel que mostraba un comportamiento distinto al resto de los matraces en operación (mayor o menor consumo de oxígeno) entre los tiempos de muestreo establecidos

**Nota 3:** La tabla se presenta con los valores de consumo de oxígeno ajustados utilizando los datos obtenidos durante la etapa experimental previa.

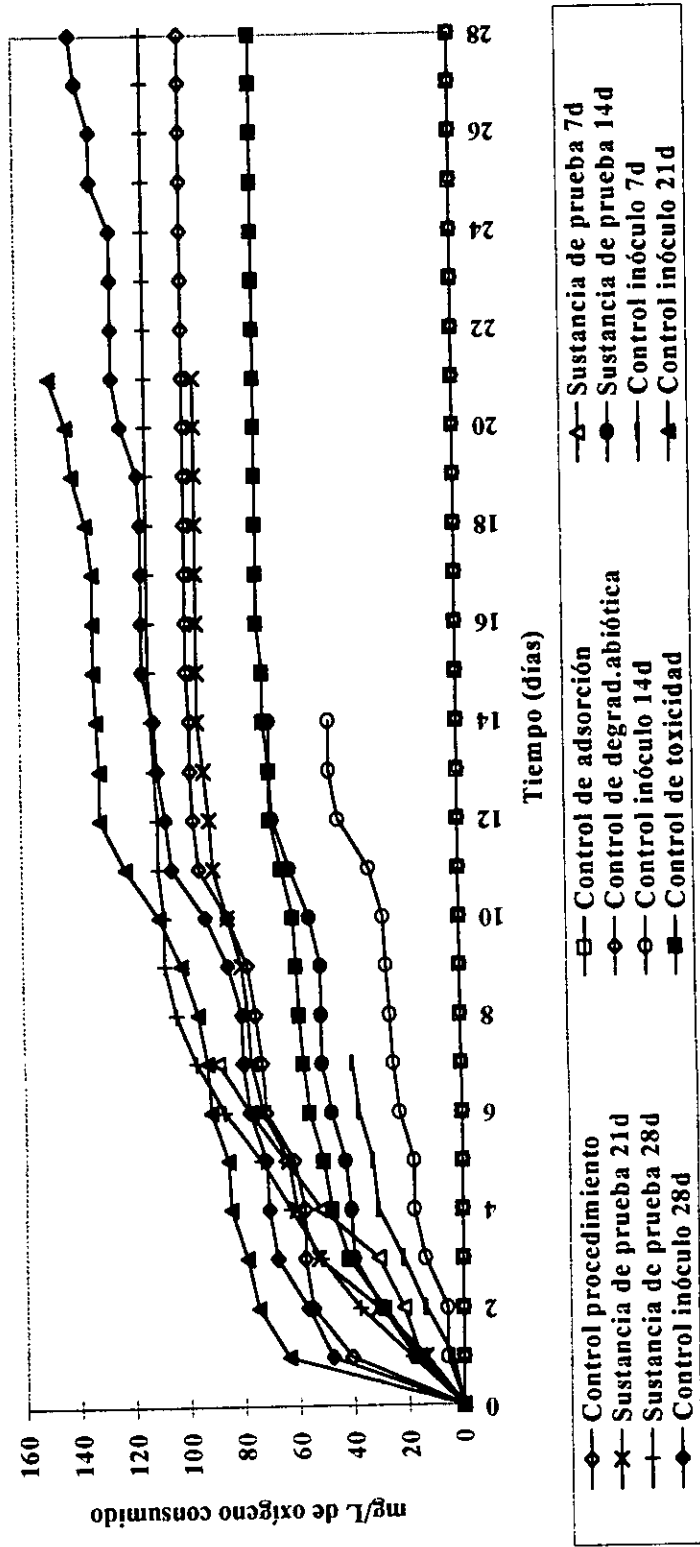


Figura 32. Perfil de comportamiento de los diferentes matraces empleados durante la prueba OECD 301-A

Tabla Núm. 26. Valores de carbono orgánico disuelto (COD) de las muestras sometidas a la prueba OECD 301-A modificada

Muestra	mgCOD/L (1)	mgCOD/L (2)	mgCOD/L promedio	Muestra	mgCOD/L (1)	mgCOD/L (2)	mgCOD/L promedio
Control procedimiento inicial	13.598	14.549	14.073 ± 0.672	Sustancia de prueba (28d)	1.970	2.164	2.067 ± 0.137
Control de adsorción inicial	14.148	13.855	14.929 ± 2.027	Control inóculo (7d)	0.644	0.595	0.619 ± 0.034
Control de degradación abiótica inicial	13.967	14.037	14.002 ± 0.207	Control inóculo (14d)	0.640	0.592	0.616 ± 0.034
Control de toxicidad inicial	29.569	28.431	29.0 ± 0.805	Control inóculo (21d)	0.716	0.509	0.613 ± 0.146
Sustancia de prueba inicial	13.495	16.363	14.929 ± 2.027	Control inóculo (28d)	0.595	0.601	0.598 ± 0.004
Control inóculo inicial	0.881	0.973	0.927 ± 0.064	Control procedimiento (28d)	1.915	2.097	2.006 ± 0.128
Sustancia de prueba (7d)	2.209	2.149	2.179 ± 0.042	Control de adsorción (28d)	8.985	8.654	8.819 ± 0.234
Sustancia de prueba (14d)	2.373	1.811	2.127 ± 0.348	Control de degradación abiótica (28d)	13.569	13.335	13.456 ± 0.165
Sustancia de prueba (21 d)	1.945	2.223	2.084 ± 0.196	Control de toxicidad (28d)	10.596	9.703	10.149 ± 0.632

Tabla Núm. 27. Valores de carbono orgánico disuelto (COD) de muestras sometidas a la prueba OECD 301-A no modificada

Muestra	mgCOD/L (1)	mgCOD/L (2)	mgCOD/L promedio	Muestra	mgCOD/L (1)	mgCOD/L (2)	mgCOD/L promedio
Control procedimiento inicial	13.598	14.549	14.073 ± 0.672	Control de adsorción (14d)	13.596	11.754	12.675 ± 1.30
Control de adsorción inicial	14.148	13.855	14.929 ± 2.027	Control de degradación abiótica (14d)	13.189	14.541	13.820 ± 0.892
Control de degradación abiótica inicial	13.967	14.037	14.002 ± 0.207	Control de toxicidad (14d)	13.782	14.491	14.136 ± 0.501
Control de toxicidad inicial	29.569	28.431	29.0 ± 0.805	Control inóculo (7d)	0.649	0.695	0.672 ± 0.032
Sustancia de prueba inicial	13.495	16.363	14.929 ± 2.027	Control inóculo (14d)	0.535	0.565	0.550 ± 0.021
Control inóculo inicial	0.881	0.973	0.927 ± 0.064	Control inóculo (21d)	0.565	0.521	0.543 ± 0.031
Sustancia de prueba (7d)	12.569	8.863	10.716 ± 2.619	Control inóculo (28d)	0.457	0.627	0.542 ± 0.119
Sustancia de prueba (14d)	9.468	6.425	7.946 ± 2.152	Control procedimiento (21d)	3.614	3.321	3.467 ± 0.208
Sustancia de prueba (21d)	5.158	6.568	5.863 ± 0.997	Control de adsorción (21d)	11256	11.676	11.466 ± 0.297
Sustancia de prueba (28d)	5.105	4.895	5.00 ± 0.148	Control de degradación abiótica (21d)	13.706	13.289	13.498 ± 0.735
Control procedimiento (7d)	6.914	8.028	7.471 ± 0.787	Control de toxicidad (21d)	12.457	10.499	11.478 ± 1.384
Control de adsorción (7d)	14.546	12.834	13.690 ± 1.210	Control procedimiento (28d)	2.587	2.985	2.786 ± 0.282
Control de degradación abiótica (7d)	13.456	14.526	13.991 ± 0.756	Control de adsorción (28d)	8.124	9.798	8.961 ± 1.183
Control de toxicidad (7d)	19.449	18.864	19.156 ± 0.413	Control de degradación abiótica (28d)	13.246	13.459	13.498 ± 0.295
Control procedimiento (14d)	4.108	4.231	4.169 ± 0.087	Control de toxicidad (28d)	5.986	6.827	6.406 ± 0.595

## ANEXO D. TÉCNICAS ANALÍTICAS DE PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS COMPLEMENTARIOS

**Anexo D.1. Demanda química de oxígeno. Método volumétrico con dicromato de potasio (APHA, 1992)**

### Fundamento

La demanda de oxígeno químico (DQO) se utiliza como una medida del equivalente de oxígeno del contenido de materia orgánica e inorgánica de una muestra susceptible de oxidación por un oxidante químico fuerte. Se prefiere el método de reflujo de dicromato a los procedimientos que utilizan otros oxidantes debido a su mayor capacidad oxidante, a su aplicabilidad, a su mayor variedad de muestras y a su fácil manipulación.

La mayor parte de la materia orgánica resulta oxidada por una mezcla a ebullición de los ácidos crómico y sulfúrico. Se somete a reflujo de 2 horas y 150°C una muestra en solución ácida fuerte con exceso conocido de dicromato de potasio. Después de la digestión el dicromato no reducido se determina con una solución valorada de sulfato ferroso amoniacal en presencia de un complejo ferroso de ortofenantrolina (ferroín indicador) como indicador interno para determinar la cantidad de  $K_2Cr_2O_7$  consumido y calcular la materia orgánica oxidable en términos de concentración (mg/L) de materia oxidable químicamente.

### Interferencias

Las especies inorgánicas reducidas como los iones ferroso ( $Fe^{2+}$ ), sulfato ( $SO_4^{2-}$ ), sulfitos ( $SO_3^{2-}$ ) y tiosulfatos ( $S_2O_3^{2-}$ ) se oxidan bajo ciertas condiciones y crean una DQO inorgánica, la cual interfiere cuando se estima el contenido de agua residual. El ion cloruro (Cl) interfiere, pero se elimina al agregar sulfato mercurico ( $HgSO_4$ ). Para eliminar una interferencia significativa de nitritos ( $NO_2^-$ ) se utiliza ácido sulfámico. Los compuestos alifáticos de cadena lineal se oxidan mejor cuando se añade sulfato de plata ( $Ag_2SO_4$ ) como catalizador.

### Reactivos para realizar DQO

- Solución patrón de dicromato de potasio ( $K_2Cr_2O_7$ ) 0.25 N
- Sulfato de plata ( $Ag_2SO_4$ ), cristales
- Reactivo de sulfato de plata en ácido sulfúrico. Disolver 22 g de sulfato de plata en 4 kg de ácido sulfúrico. Proteger de la luz.
- Solución indicadora de ferroín
- Sulfato ferroso amoniacal patrón para titulación 0.05 N (SFA)
- Sulfato mercúrico ( $HgSO_4$ ), cristales o polvo
- Acido sulfámico (Sólo si se va a inhibir nitrificación)
- Ftalato ácido de potasio.

### Equipo

El equipo empleado es un Behr, el cual consta de una parrilla, con control de temperatura y tiempo, de calentamiento para 24 muestras, 2 canastillas metálicas con 24 vasos de reacción de 200 ml de capacidad, cada uno de ellos con un tubo refrigerante que permite la condensación, mediante enfriamiento por aire, de los vapores generados durante el periodo de reflujo.

### Procedimiento

1. Centrifugar las muestras por analizar (3600 rpm a 5 °C durante 15 minutos)
2. Poner en el recipiente de reflujo:
  - 10 mL de la muestra diluida (con agua destilada) en proporción 1:50 o la dilución que se considere pertinente. En la preparación del blanco (testigo) se utilizan 10 mL de agua destilada como muestra.
  - 0.2 g de  $HgSO_4$
  - 5.0 mL de solución de  $K_2Cr_2O_7$  0.25 N, mezclar.
3. Colocar el refrigerante y añadir lentamente 15 mL de reactivo de sulfato de plata en ácido sulfúrico concentrado.
4. Colocar los matraces de reacción en la parrilla eléctrica, manteniéndolos en reflujo a 150 °C durante dos horas.



5. Enfriar y agregar al recipiente de reflujo 40 mL de agua destilada y dos gotas de ferroín indicador, homogenizar.
6. Titular con sulfato ferroso amoniacal 0.05 N. El punto final de la valoración es el cambio de coloración de azul verdoso a pardo rojizo.

### Cálculo

$$\text{mg DQO/L} = \frac{(A-B) \times N \times 8000}{\text{mL muestra (f)}}$$

A = Volumen de sulfato ferroso amoniacal gastado para valorar el blanco

B = Volumen de sulfato ferroso amoniacal mL gastado para valorar la muestra

N = Normalidad del sulfato ferroso amoniacal

f = Fracción volumétrica decimal de la muestra inicial en la solución de la cual se tomó la alícuota de 10 mL para la determinación

### Normalidad del sulfato ferroso amoniacal (SFA)

En un matraz se colocan:

- 10 mL de dicromato de potasio 0.05 N.
- 40 mL de agua destilada
- 10 mL de ácido sulfúrico concentrado (enfriado constantemente)

La solución anterior se titula con sulfato ferroso amoniacal con una normalidad aproximada de 0.05 y se anotan los mL gastados para lograr el cambio de color pardo rojizo.

$$N_{\text{SFA}} = \frac{\text{mL de dicromato de potasio consumidos} \times \text{Normalidad del mismo}}{\text{mL de SFA empleados en la titulación}}$$

## **Anexo D.2. Determinación de carbono orgánico disuelto**

### **Fundamento**

El carbono orgánico corresponde a diversos compuestos orgánicos en varios estados de oxidación. Para determinar la cantidad de carbono orgánico, las moléculas deben de romperse en unidades de carbono simples y ser convertidas a una forma molecular más sencilla que pueda medirse de manera cuantitativa. Se define como carbono orgánico disuelto a la fracción de carbono orgánico total que atraviesa un filtro con tamaño de poro de 0.45  $\mu\text{m}$ .

Se homogeniza y diluye la muestra según sea necesario, y se inyecta en una cámara de reacción caliente rellena con un catalizador oxidante (ejemplo, óxido de cobalto). El agua se vaporiza y el carbono orgánico se oxida hasta dióxido de carbono y agua. El dióxido de carbono de la oxidación del carbono es transportado mediante corrientes transportadoras y se detecta.

En el caso específico del equipo EA 1110 CHNS-O CE Instruments, la técnica se basa en el análisis elemental para la determinación selectiva de carbono orgánico en muestras sólidas que contienen carbonatos. La diferenciación entre formas orgánicas e inorgánicas se logra por medio de la manipulación de la muestra antes del análisis, por lo que las mismas condiciones instrumentales son usadas para realizar determinaciones de carbono orgánico disuelto y total en las siguientes corridas. El método consiste en acidificar la muestra con ácido clorhídrico en una cápsula de plata especial. Los carbonatos reaccionan convirtiéndose a dióxido de carbono, mientras que los compuestos orgánicos solubles quedan en la fase líquida de la cápsula. El contenedor es cerrado y se seca a 80-100°C, posteriormente se coloca en el analizador elemental.

El dióxido de carbono producido por la combustión completa de la muestra es separado por una columna a través de cromatografía de gases y detectada a través de un detector TCD. Los resultados experimentales obtenidos de esta manera están directamente relacionados con el peso de la muestra. Para la determinación de carbono orgánico disuelto, la muestra debe ser

### **c) Sólidos suspendidos totales, suspendidos volátiles y suspendidos fijos**

#### **Fundamento**

Los sólidos suspendidos totales son la porción de los sólidos totales retenida por un filtro, por lo tanto es necesario filtrar una muestra bien mezclada por un filtro estándar de fibra de vidrio y el residuo retenido en el mismo se seca a peso constante a 103-105°C. El aumento de peso en el filtro representa los sólidos totales en suspensión. Pueden obtenerse los sólidos suspendidos volátiles y los sólidos suspendidos fijos por calcinación de la muestra a 550°C durante 30 minutos.

#### **Interferencias**

Eliminar las partículas gruesas flotables o aglomerados sumergidos de material no homogéneo si se decide que su inclusión no es deseable en el resultado final. Un residuo excesivo sobre el filtro puede formar una costa hidrófila por lo que hay que limitar el tamaño de la muestra para que no sea mayor de 200 mg. El tiempo de filtración muy prolongado puede dar resultados muy elevados, debido a la cantidad excesiva de sólidos capturados en el filtro.

#### **Material**

- Crisoles Gooch
- Horno de secado a 103-105°C
- Horno de mufla a  $550 \pm 50^\circ\text{C}$
- Desecador
- Aparato de filtración al vacío
- Pinzas de crisol
- Balanza analítica capaz de pesar hasta 0.1 mg

#### **Procedimiento**

1. Lavar crisoles Gooch y secarlos.

2. Insertar un disco de fibra de vidrio con la cara rugosa hacia arriba en el crisol. Hacer vacío y lavarlo con agua destilada. Eliminar toda el agua e introducir los crisoles en la estufa a 105°C durante 1 hora.
3. Sacar los crisoles y conservarlos en el desecador. Dejar enfriar aproximadamente 40 minutos.
4. Pesar los crisoles en la balanza analítica. Comprobar que se encuentran a peso constante (Peso A)
5. Montar el aparato de filtración e iniciar la succión. Filtrar un volúmen medido de muestra (5 o 10 mL) bien mezclada. Retirar el crisol del aparato de filtrado.
6. Meter en la estufa a 103-105°C durante 1 o 2 horas dependiendo de la cantidad de muestra.
7. Sacar los crisoles y conservar en el desecador. Enfriar 40 minutos aproximadamente.
8. Pesar en balanza analítica (Peso B). Repetir el ciclo de secado, enfriado, desecación y pesado hasta obtener un peso constante o hasta que la pérdida de peso sea menor al 4% o menor de 0.5 mg
9. Introducir las crisoles en la mufla a 550°C durante 25-30 minutos.
10. Sacar los crisoles y conservarlos en el desecador. Enfriar aproximadamente 40 minutos.
11. Pesar en balanza analítica. Repetir el ciclo de incineración, enfriado, desecación y pesado hasta obtener un peso constante o que la pérdida de peso sea menor del 4% del peso previo (Peso C).

### Cálculos

$$\text{Sólidos suspendidos totales (SST)} = \frac{(B-A) \times 1 \times 10^6}{5 \text{ mL}} = \text{mg/L}$$

$$\text{Sólidos suspendidos volátiles (SSV)} = \frac{(B-C) \times 1 \times 10^6}{5 \text{ mL}} = \text{mg/L}$$

$$\text{Sólidos suspendidos fijos (SSF)} = \frac{(C-A) \times 1 \times 10^6}{5 \text{ mL}} = \text{mg/L}$$

Peso A: Peso del crisol con el filtro, Peso B: Peso del crisol con el filtro + residuo seco, Peso C: Peso del crisol con el filtro + residuo calcinado

#### **Anexo D.5. Determinación de ortofosfatos. Método colorimétrico del ácido vanadomolibdofosfórico (APHA, 1992)**

##### **Fundamento**

En una solución diluida de ortofosfato, el molibdato amónico reacciona en condiciones ácidas para formar un heteropoliácido, ácido molibdofosfórico. En presencia de vanadio, se forma ácido vanadomolibdofosfórico amarillo. La intensidad del color amarillo es proporcional a la concentración de fosfato.

##### **Preparación de reactivos**

- Reactivo vanadato-molibdato. Solución A: Disolver 25 g de molibdato amónico  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  en 300 mL de agua destilada. Solución B. Disolver 1.25 g de metavanadato de amonio  $\text{NH}_4\text{VO}_3$ , calentando a ebullición en 300 mL de agua destilada. Enfriar y añadir 330 mL de ácido clorhídrico concentrado. Enfriar a temperatura ambiente, verter y mezclar ambas soluciones. Aforar a 1000 mL con agua destilada.
- Solución patrón: Disolver 219.5 mg  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  anhidro en agua destilada y diluir a 1000 mL =  $50\mu\text{g}$  de  $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ .

##### **Procedimiento**

1. Filtrar las muestras a través de filtro con tamaño de poro de  $0.45\mu\text{m}$ .
2. Poner 35 mL de muestra o menos conteniendo de 0.05 a 0.1 mg de fósforo en un matraz aforado de 50 mL. Añadir 10 mL de reactivo vanadato-molibdato y diluir con agua destilada.
3. Preparar de manera similar un blanco con agua destilada

4. Al cabo de 10 minutos, medir la absorbancia frente a un blanco ( $\lambda$  de 400 a 490 nm). El color es estable durante días y su intensidad no es afectada por las variaciones de temperatura.

#### Cálculo

$$\text{mg P/L} = \frac{\text{mg P (en 50 mL volumen final)} \times 1000}{\text{mL de muestra}}$$

#### Concentración mínima detectable

La concentración mínima detectable es de 200  $\mu\text{g P/L}$  en celdas de espectrofotómetro de 1 cm

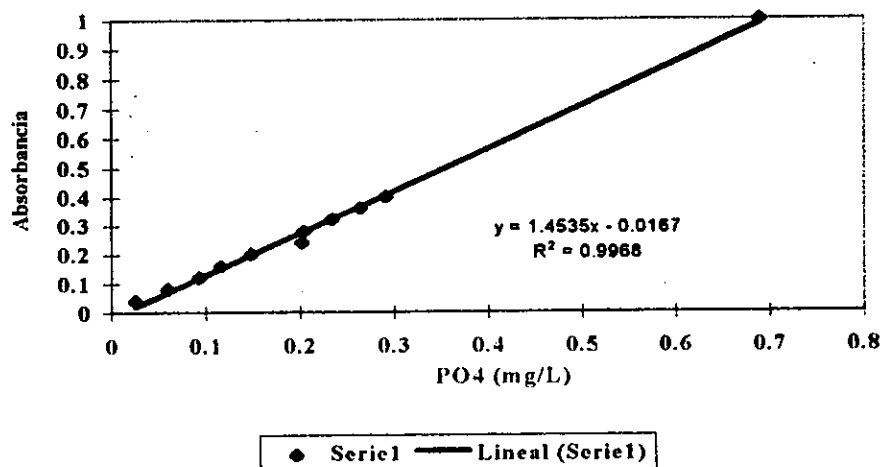


Figura 33. Curva de calibración de ortofosfatos

## ANEXO E. TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS EMPLEADAS

### Anexo E.1. Preparación y esterilización del material

#### Procedimiento:

1. Lavar todo el material de vidrio con jabón (de preferencia usar Dextran), para eliminar la materia orgánica presente. Enjuagar con abundante agua de la llave y al final con agua destilada para eliminar los residuos de detergente, así como las sustancias corrosivas.
2. Secar el material de vidrio a temperatura ambiente o en una estufa.
3. Poner en la boquilla de las pipetas un pedazo de algodón, de tal manera que el aire pase libremente a través de él.
4. Envolver con papel kraftín cada pipeta y espátula de Drigalski. Marcar en la envoltura el volumen de cada pipeta.
5. Esterilizar el material de vidrio en horno a temperatura de 170-180°C durante 1-2 horas o en autoclave a 115°C durante 15 minutos.

#### • Solución salina isotónica

En un matraz Erlenmeyer, agregar la cantidad de cloruro de sodio a preparar, disolverlo. Distribuir 9 mL de solución en cada uno de los tubos con tapa de baquelita no hay que apretar totalmente la tapa hasta después de la esterilización.

### Anexo E.2. Preparación de medios de cultivo

Se prepararán las placas con medio de cultivo de acuerdo a las diluciones que se quieran sembrar.

1. Colocar la mitad del volumen total de agua destilada en el matraz en donde se va a preparar el medio de cultivo.
2. Pesar en un pedazo de papel aluminio, cada uno de los componentes del medio. Cada vez que pese un reactivo, limpiar perfectamente la espátula para evitar contaminación de reactivos. Adicionar el primer componente y disolverlo, adicionar los siguientes

hasta que se haya disuelto el componente anterior (respetar el orden indicado en las formulaciones).

3. Adicionar la otra mitad de agua y homogenizar el contenido.
4. Ajustar el pH del medio.
5. Proceder a calentarlo, de preferencia en baño maría. Tapar el matraz con una torunda de algodón para evitar pérdida de agua y concentrar el calor. Al estar calentando, tener cuidado de agitar constantemente para evitar que el agar se queme. El medio está listo cuando es transparente.
6. Tapar cada matraz con torunda de algodón y cubrirlo con un gorrito de papel kraftin (esta protege a los algodones y evita que durante la esterilización estos se humedezcan).
7. Meter los matraces en autoclave, cerrarla, dejar calentar con la válvula abierta y esperar a que el aire del interior del autoclave sea desplazado totalmente por el vapor de agua, lo que se habrá conseguido, cuando a través de la válvula salga una columna continua de vapor de agua. Cerrar la válvula y esperar a que la presión suba hasta 15 libras de presión y a una temperatura alrededor de 120-121°C, mantener en estas condiciones durante 15 minutos.
8. Al término del ciclo de esterilización, apagar el autoclave, esperar a que la presión baje a cero y sacar el material.
9. Dejar enfriar los medios hasta una temperatura aproximada de 45 a 50°C. Junto a la flama del mechero abrir el matraz y vaciar aproximadamente de 15 a 20 mL de medio en cada una de las cajas de plástico estériles. Dejar enfriar durante 20 minutos hasta que solidifique el medio y después voltearlas para evitar que se forme agua de condensación en las tapas.
10. Si los medios no se van a usar inmediatamente, colocar las cajas en bolsas de poliestireno, etiquetar cada paquete indicando el nombre de la persona que preparó el medio, fecha de preparación y nombre del medio y almacenarlos en refrigeración.
11. Para su uso, los medios deben sacarse del refrigerador con una hora de anticipación.



- **Agar nutritivo o gelosa**

Rehidratar 23 g del medio de cultivo en un litro de agua destilada. Calentar hasta disolución total. Esterilizar en autoclave a 115°C durante 15 minutos.

- **Agar almidón**

Peptona de carne	5.0 g
Extracto de levadura	5.0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5.0 g
Almidón soluble	3.0 g
Agar bacteriológico	18.0 g

En 300 mL de agua solubilizar el almidón calentando y agitando; solubilizar los otros ingredientes en los 700 mL restantes, mezclar las dos partes. Ajustar el pH a 7.0 y esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Dejar enfriar aproximadamente a 45°C y vaciar de 15 a 20 mL de medio en cajas de Petri.

- **Agar leche descremada**

Solución "A"

Dextrosa	10.0 g
Agar bacteriológico	20.0 g

Solución "B"

Leche descremada	15.0 g
------------------	--------

En un matraz Erlenmeyer de 500 mL, colocar 250 mL de agua destilada, disolver la leche y esterilizar a 110°C durante 10 minutos. En otro matraz poner 750 mL de agua, agregar el agar y la dextrosa, fundir y esterilizar a 110°C durante 10 minutos. En condiciones de asepsia

incorporar la leche a la solución "A", homogenizar y dejar enfriar aproximadamente a 45°C y vaciar de 15 a 20 mL de medio en cajas de Petri.

Nota: Respetar los tiempos de esterilización.

- **Medio mínimo**

Solución 1

Fosfato dibásico de potasio	7.0 g
Fosfato monobásico de potasio	2.0 g
Sulfato de amonio	1.0 g
Citrato de sodio	0.5 g

Disolver en 250 mL de agua destilada.

Solución 2

Agar bacteriológico	16.0 g
---------------------	--------

Disolver en 500 mL de agua destilada, fundir.

Solución 3

Sacarosa o glucosa	4.0 g
--------------------	-------

Disolver en 250 mL de agua destilada

Esterilizar cada una de las soluciones por separado, enfriar y mezclarlas. En condiciones de asepsia agregar: 1 mL de sulfato de magnesio al 10% y 1 mL de vitamina B1 (tiamina) al 2% (esterilizar la vitamina por filtración). Homogenizar y dejar enfriar aproximadamente a 45°C y vaciar de 15 a 20 mL de medio en cajas de Petri.

- **Agar-celulosa**

Agar	15.0 g/L de medio
------	-------------------

celulosa (madera, algodón, papel o cartón)

Colocar en un mortero un peso conocido de celulosa, macerar. Agregar a la cantidad de medio a preparar, disolver por calentamiento. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Homogenizar y dejar enfriar aproximadamente a 45°C y vaciar de 15 a 20 mL de medio en cajas de Petri.

### **Anexo E.3. Técnica para la cuenta de microorganismos. Método de extensión superficial**

Al desarrollar las técnicas en superficie para el recuento de microorganismos, debe ponerse especial cuidado en la preparación de las placas previo a su inoculación; la superficie de la placa ha de encontrarse libre de humedad excesiva para evitar o limitar la confluencia y extensión del desarrollo bacteriano, y permite una definición clara de las colonias.

#### **• Preparación de las diluciones**

1. En condiciones de asepsia, colocar cada uno de los tubos que contienen 9.0 mL exactos del diluyente (solución salina isotónica) en una gradilla e identificarlos con la dilución correspondiente ( $10^{-2}$  a  $10^{-8}$ ).
2. Mezclar la muestra mediante agitación enérgica.
3. En condiciones de asepsia, introducir la pipeta a 2.5 cm de profundidad, tomar 10 mL y transferirlos al frasco que contiene 90 mL del diluyente (dilución 1:10), teniendo cuidado de colocar la punta 1 cm arriba de la superficie del líquido, una vez que se haya vaciado la pipeta, esperar 3 segundos y soplar. Eliminar la pipeta.
4. Tapar el frasco y agitarlo mediante movimientos de abajo hacia arriba (agitación vigorosa).
5. Mezclar nuevamente el contenido del frasco, introduciendo una pipeta limpia a 2.5 cm de profundidad del líquido, tomar 1 mL y transferirlo al primer tubo (dilución 1:100), teniendo cuidado de que la pipeta no haga contacto con el líquido. Eliminar la pipeta.
6. Repetir el procedimiento del inciso 5 y preparar las siguientes diluciones, transfiriendo en cada ocasión 1 mL de la dilución anterior al siguiente tubo que contiene 9.0 mL de diluyente.

7. Con una pipeta limpia y estéril, mezclar el contenido de la dilución de interés en la forma antes indicada, tomar 0.1 mL de la dilución y colocarlo en el centro de la placa bien seca.
8. En condiciones de asepsia, con la espátula de Drigalski (varilla de vidrio con ángulo), extender la gota sobre toda la superficie del medio.
9. Con pipetas limpias repetir el procedimiento e inocular las cajas correspondientes con las diluciones de interés.
10. Dejar que la muestra se absorba en el medio, invertir la caja e incubar a 35°C durante 24 y 48 horas.
11. Después de la incubación, observar el efecto de la dilución. Cuando esta sea aparente, seleccionar las placas que muestren entre 30 y 300 colonias.
12. Colocar la caja, con la tapa hacia abajo y la base hacia arriba y marcar cada colonia con plumón o lápiz graso.
13. Contar el número de colonias desarrolladas en la superficie y calcular el número de microorganismos/mL de la muestra con la siguiente fórmula:

$$\text{Promedio de colonias contadas} \times 10 \times \text{Recíproco de la dilución} = \text{UFC/mL}$$

El resultado se expresa como *unidades formadoras de colonias* (UFC), no como microorganismos.

#### **E.4. Tinción de Gram**

Esta técnica se basa en la tinción diferencial de la pared celular de las bacterias, debido a la presencia de los polisacáridos que la constituyen. Consiste en aplicar 4 reactivos que son:

- Cristal violeta: Funciona como colorante primario; imparte color a todos los microorganismos.
- Lugol: Actúa como mordente, por lo tanto aumenta o refuerza la unión entre el colorante y el sustrato, formando un complejo cristal violeta-yodo-ribonucleato de magnesio

- **Alcohol-acetona:** Actúa como decolorante disolviendo y arrastrando el colorante primario de las células, en este paso las bacterias Gram positivas cuya pared celular es relativamente gruesa, con mayor contenido de peptidoglucano y con numerosos enlaces transversales entre las cadenas de N-acetil glucosamina y N-acetil murámico son deshidratadas, por lo que conservan el complejo de cristal violeta-yodo; mientras que las bacterias Gram negativas se vuelven invisibles, ya que el decolorante disuelve los lípidos de la pared celular facilitando la salida del complejo cristal violeta-yodo.
- **Safranina:** Actúa como colorante de contraste, por lo que las bacterias Gram negativas toman una coloración rojiza después de su adición.

#### **Preparación de reactivos**

- **Cristal violeta**

##### **Solución A**

Cristal violeta	2.0 g
Etanol (95%)	20.0 mL

##### **Solución B**

Oxalato de amonio	0.8 g
Agua	80.0 mL

Dejar la solución de oxalato de amonio en reposo toda la noche o calentar débilmente hasta que se solubilice. Después mezclar con la solución de cristal violeta y filtrar.

- **Lugol (solución de iodo iodurado)**

Iodo metálico	1.0 g
Ioduro de potasio	2.0 g
Agua destilada	300.0 mL

En un mortero mezclar y moler finamente el iodo y el ioduro de potasio, agregar una pequeña cantidad de agua para lavar, aforar y agitar vigorosamente.

- **Alcohol-acetona**

Etanol (95%)	800.0 mL
Acetona	200.0 mL

- **Safranina**

Safranina	0.25 g
Etanol (95%)	10.0 mL
Agua	100.0 mL

Disolver la safranina en el alcohol, agregar el agua destilada y filtrar a través de papel filtro.

### Procedimiento

1. Sobre un portaobjetos hacer un frotis de la muestra, dejarlo secar al aire y pasarlo por la flama de un mechero.
2. Cubrir la preparación fija con cristal violeta y dejarlo actuar por 1 minuto, moviendo ligeramente el portaobjetos para favorecer el contacto del colorante con las células. Escurrir el colorante y lavar con agua corriente.
3. Cubrir la preparación con lugol y dejarlo actuar por 1 minuto, escurrir el exceso de reactivo y lavar con agua corriente.
4. Decolorar con una mezcla de alcohol - acetona, mientras se sostiene ligeramente inclinada la preparación para que el decolorante resbale lentamente por ella. Cuando ya no se registre arrastre de color, lavar con agua para detener la acción del decolorante.
5. Adicionar la safranina y dejarla actuar por 1 minuto. Escurrir el exceso, lavar con agua y dejar secar al aire.
6. Observar al microscopio. Las bacterias serán Gram-positivas si conservan el color azul-violeta del primer colorante empleado, en caso de presentar coloración roja o parda o ninguna, serán Gram-negativas.