

Facultad de Ciencias
Químicas e Ingeniería

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DE UNA CEPA BACTERIANA PARA SU APLICACIÓN EN EL TRATAMIENTO DE AGUA RESIDUAL

Tesis profesional para obtener el título de:

Licenciado en Químico Industrial

Presenta:

Ricardo Carrera Morales

Asesora:

Dra. María de Jesús Cruz Carrillo

Cuernavaca, Morelos, mayo 2023

COMITÉ REVISOR

Dra. Genoveva Bustos Rivera Bahena

Dra. María de Jesús Cruz Carrillo

Dra. Carolina Bustos Rivera Bahena

Dra. Catalina Bustos Rivera Bahena

Ing. Marlene Acosta Silva

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María de Jesús Cruz Carrillo por su paciencia, apoyo y asesoría, en todo momento de mi estadía en el laboratorio de análisis industriales de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, además de compartirme de su conocimiento en el rubro de las aguas residuales, donde por ahora me desenvuelvo.

A la Dra. Genoveva Bustos Bahena Rivera que tras varios cursos que me impartió a lo largo de mi carrera, tuvo la confianza en su servidor, para poder trabajar con ella en el servicio social y me indujera a continuar con la investigación del presente trabajo.

A los técnicos académicos del laboratorio de la FCQ e I, que estuvieron siempre en la disposición de proporcionarme material y reactivos para la investigación.

DEDICATORIAS

Mi madre, S. Guadalupe Morales, que cuando le dije quería continuar con la Universidad, no dudó en estar siempre al pendiente de mí, con todo ese apoyo moral, esas palabras de aliento, ánimos y por supuesto, lo económico. Hoy todo ese esfuerzo se ve recompensado.

A mi padre Francisco Carrera, por haber sido esa luz de precaución, aconsejarme en muchas cuestiones de la vida para que hoy sea un hombre de bien. Cuanto me hubiera gustado presenciaras este momento, donde quiera que te encuentres, espero que estes orgulloso de tu hijo.

Para mi segunda madre, mi hermana Elizabeth, por esas veces en las que uno necesitaba un extra de apoyo, estabas ahí.

A la familia que formé, mi esposa e hijo, cuando las cosas se complicaban fueron ese motorcito que me impulsaba a salir ante toda dificultad.

ÍNDICE

ÍNDICE	Pg
Índice de tablas.....	1
Índice de figuras.....	1
Índice de fotos	2
Nomenclaturas	3
Abreviaturas	4
RESUMEN	5
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	6
1.1 Hipótesis	6
1.2 Justificación.....	6
1.3 Objetivo general.....	7
1.4 Objetivos específicos.....	7
CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO.....	8
2.1 Características físicas de las aguas residuales.....	8
2.1.1 Temperatura	8
2.1.2 Sólidos suspendidos totales	9
2.2 Constituyentes inorgánicos no metálicos	9
2.2.1 pH	9
2.2.2 Fósforo en agua residual	9
2.3 Constituyentes orgánicos.....	10
2.3.1 Demanda bioquímica	10
2.3.2 Demanda química de oxígeno.....	11
2.4 Tratamiento de aguas residuales	11
2.4.1 Tratamiento biológico ¿Cómo funciona?.....	13
2.4.2 Los microorganismos y el agua	13
2.4.3 La labor de los microorganismos.....	15
2.5 Identificación de bacterias	16
2.5.1 Tinción de Gram	16

2.5.2 Pruebas bioquímicas	17
2.5.3 Caldo rojo de fenol	17
2.5.4 Citrato de Simmons	17
2.5.6 Medio SIM	18
2.5.7 Prueba agar almidón	18
2.5.8 Prueba de caldo urea	18
2.5.9 Prueba de la catalasa.....	19
CAPÍTULO 3. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	20
3.1 Materiales	22
3.2 Equipos	22
3.3 Reactivos	23
3.4 Preparación reactivos microbiológicos (medios de cultivo)	23
3.5 Procedimiento.....	24
3.5.1 Métodos microbiológicos. Aislamiento y caracterización de la bacteria.....	24
3.5.1.1 Aislamiento cepa	25
3.5.1.2 Tinción de Gram	25
3.5.1.3 Pruebas bioquímicas	25
3.5.1.3.1 Caldos con indicador rojo de fenol.....	25
3.5.1.3.2 Prueba citrato de Simmons	25
3.5.1.3.3 Prueba en medio SIM	26
3.5.1.3.4 Prueba de agar almidón	26
3.5.1.3.5 Prueba de la urea	26
3.5.1.3.6 Prueba de la catalasa	26
3.5.1.3.7 Crecimiento en medio ácido	26
3.5.1.3.8 Prueba de anaerobiosis.....	26
3.5.2 Métodos analíticos. Caracterización de las aguas residuales de la PTAR del centro educativo	27
3.5.2.1 Muestreo.....	27
3.5.2.2 Demanda química de oxígeno (DQO). Método refluo cerrado.....	27
3.5.2.3 Sólidos suspendidos totales	28
3.5.2.4 Fósforo total	29
3.5.3 Determinación de la capacidad de remoción de la DQO con la cepa aislada	30
3.5.3.1 Obtención de la biomasa.....	30

3.5.3.2 Remoción de la materia orgánica.....	31
CAPÍTULO 4. RESULTADOS.....	33
4.1 Aislamiento y caracterización de la cepa	33
4.1.1 Aislamiento de la cepa	33
4.1.2 Tinción Gram	34
4.1.3 Pruebas bioquímicas	34
4.1.3.1 Caldos con indicador rojo de fenol.....	34
4.1.3.2 Caldo urea	35
4.1.3.3 Medio citrato de Simmons	36
4.1.3.4. Medio SIM	37
4.1.3.5 Prueba de agar almidón	38
4.1.3.6 Prueba de la catalasa.....	38
4.1.3.7 Prueba de Anaerobiosis	39
4.1.3.8 Acidificación del medio nutritivo	40
4.2 Caracterización del agua residual PTAR	41
4.2.1 Muestreo.....	41
4.2.2 Solidos suspendidos totales	43
4.2.3 Demanda química de oxígeno (DQO).....	44
4.2.5 Fósforo total	46
4.3 Determinación de la capacidad de remoción de la DQO con la cepa aislada	48
CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES.....	51
PERSPECTIVAS.....	52
REFERENCIAS.....	53

Índice de tablas	Pg
Tabla 1. Composición del medio mineral nutriente.....	31
Tabla 2. Resultados de los parámetros físicos: temperatura, pH y conductividad	42
Tabla 3. Resultados de los análisis de DQO.....	45
Tabla 4. Resultados de fósforo total	48
Tabla 5. Resultados de la remoción de la materia orgánica medida como DQO.....	49

Índice de figuras

Fig. 1. Esquema de desarrollo experimental	21
Fig. 2. Colonias definidas	33
Fig. 3. Crecimiento extendido.....	33
Fig. 4. Bacteria envejecida.....	33
Fig. 5. Tinciones vistas en microscopio óptico lente X100.	34
Fig. 6. Caldo sacarosa.....	35
Fig. 7. Caldo con lactosa.....	35
Fig. 8. Caldo glucosado	35
Fig. 9. Caldo con manitol	35
Fig. 10. Tubos con medio de urea	36
Fig. 11. Muestra a las 48 h.....	37
Fig. 12. Medio SIM con crecimiento	37
Fig. 13. Colonias con tintura de yodo	38
Fig. 14. Prueba catalasa positiva.....	39
Fig. 15. Cámara de anaerobiosis	39
Fig. 16. Crecimiento bacteriano en condiciones anaerobias	40
Fig. 17. Crecimiento bacteriano en medio nutritivo ácido.....	41
Fig. 18. Seguimiento de los SST	43

Fig. 19. Curva de calibración DQO	44
Fig. 20. Seguimiento y eficiencia de remoción de la DQO	45
Fig. 21. Curva de calibración de fósforo	47
Fig. 22 Resultados de fósforo total	48
Fig. 23. Eficiencias de remoción y concentraciones de DQO a las diferentes relaciones MM:AR. Replica 1	50
Fig. 24. Eficiencias de remoción y concentraciones de DQO a las diferentes relaciones MM:AR. Replica 2	50

Índice de fotos

Foto 1. Muestreo.....	41
Foto 2. Curva de calibración de DQO.....	44
Foto 3. Curva de calibración del fósforo.....	46

Nomenclaturas

Sulfato de amonio	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
Fosfato básico de potasio	K_2HPO_4
Fosfato dibásico de potasio	KH_2PO_4
Ácido cítrico	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$
Sulfato de magnesio hepta hidratado	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
Sulfato de manganeso	MnSO_4
Cloruro de calcio	CaCl_2
Sulfato de hierro hepta hidratado	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
Ácido sulfúrico	H_2SO_4
Persulfato de amonio	$(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$
Hidróxido de sodio	NaOH
Ácido nítrico	HNO_3
Glicerol	$\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$
Cloruro estanoso di hidratado	$\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
Heptamolibdato de amonio tetra hidratado	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
Dicromato de potasio	$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$
Sulfato de mercurio	HgSO_4
Sulfato de plata	AgSO_4
Biftalato de potasio	$\text{C}_8\text{H}_5\text{KO}_5$
Agua oxigenada	H_2O_2

Abreviaturas

A.R.	Agua residual
A.N.	Agar nutritivo
cm	Centímetro
C.N.	Caldo nutritivo
DQO	Demanda química de oxígeno
DBO	Demanda bioquímica de oxígeno
LMP	Límites máximos permisibles
h	hora
SST	Sólidos suspendidos totales
PTAR	Planta tratadora de aguas residuales
SEMARNAT	Secretaría de medio ambiente y recursos naturales
PET	Polietileno
pH	Potencial de hidrógeno
MO	Materia orgánica
N	Nitrógeno
NOM	Norma oficial mexicana
C	Carbono
P	Fósforo
CONAGUA	Comisión nacional del agua
°C	Grados centígrados
mg/L	Miligramos por litro
ppm	Partes por millón
mL	Mililitros
μ	Micras
μS	Micro siemens
SIM	Sulfuro indol movilidad
rpm	Revoluciones por minuto
nm	Nanómetros
UV	Luz ultravioleta

RESUMEN

Hoy en día la situación del agua, un recurso tan importante e invaluable para la vida, se ha visto afectada por la contaminación algo que se ha acrecentado, debido a las industrias, la agricultura, ganadería y desde luego, la sociedad misma, por esta razón, la ciencia y el hombre han desarrollado métodos y procesos para que el impacto al ambiente se vea reducido y así se pueda reutilizar el agua, que en otras épocas simplemente sería desechada. La Contaminación del agua se produce por el vertimiento en ella de un elemento o compuesto, orgánico o inorgánico, que disuelto, disperso o suspendido, alcance una concentración que exceda la tolerancia para un uso determinado (Jaramillo, 2013). Por lo anterior, en el presente trabajo de tesis, se unieron dos ciencias: la microbiología y la química para poder contribuir a la solución de este problema que acecha a la sociedad.

En el presente trabajo se evaluó la capacidad de degradación de la materia orgánica, medida como DQO, empleando una bacteria aislada a partir de un cultivo comercial. La bacteria aislada y caracterizada se identificó como "*bacillus coagulans*". La capacidad de remoción de materia orgánica con la bacteria aislada, utilizando las aguas residuales provenientes de una planta de tratamiento de agua residual (PTAR) de un centro educativo, fue del 52 %.

Adicionalmente se caracterizaron las aguas residuales de la PTAR del centro educativo. Se determinó que la PTAR del centro educativo cumple con los límites máximos permisibles especificados en la NOM- 001-SEMARNAT-2021, para los parámetros de DQO, solidos suspendidos totales y temperatura. Con respecto al fósforo, se observó que los resultados se encontraron ligeramente arriba de los límites máximos permisibles por la norma de referencia.

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

La planta tratadora de aguas residuales (PTAR) de un centro educativo ubicado en Cuernavaca Morelos, fue implementada para dar cumplimiento a la normatividad ambiental: NOM-001-SEMARNAT-1996, que establece los límites permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en cuerpos receptores propiedad de la nación.

Esta PTAR recibe la descarga de aguas provenientes de sanitarios, tarjas de laboratorio y agua pluvial, sin embargo, la cepa bacteriana utilizada para el buen funcionamiento de la PTAR genera gastos para el tratamiento de las aguas residuales. Por otro lado, no se han realizado los análisis correspondientes para determinar si la PTAR cumple con la norma. Por lo anterior, en el presente trabajo se pretende, por un lado, caracterizar las aguas residuales de la PTAR utilizando dos parámetros básicos de la NOM-001-SEMARNAT-1996, y demanda química de oxígeno (DQO), que nos indica la cantidad de materia orgánica presente. Así como determinar la eficiencia de remoción de la materia orgánica expresada como DQO empleando una cepa bacteriana aislada de un cultivo comercial, con lo cual se eliminarían los costos generados en la compra de la cepa.

1.1 Hipótesis

La bacteria aislada y caracterizada de un cultivo comercial es capaz de remover el 80% de la materia orgánica expresada como DQO, presente en el agua residual de la planta de tratamiento de un centro educativo.

1.2 Justificación

El incremento en el deterioro de la calidad del agua ha sido ocasionado, entre otras cosas por las descargas de aguas residuales no tratadas en ríos, barrancas y alcantarillado público, por lo que es importante implementar sistemas de tratamiento de las aguas generadas. Dentro de los procesos de tratamiento más comúnmente empleados se pueden enunciar: procesos físicos, químicos y biológicos. En el

tratamiento biológico se utilizan microorganismos (entre los que destacan las bacterias) para llevar a cabo la eliminación de componentes solubles en el agua. Estos procesos aprovechan la capacidad de las bacterias de asimilar la materia orgánica y los nutrientes (N y P) disueltos en el agua residual para su propio crecimiento. La PTAR del centro educativo, emplea un proceso biológico para la degradación de los contaminantes presentes, este proceso emplea una cepa bacteriana comercial, lo cual genera un costo extra en el proceso. Por lo tanto, al identificar las bacterias presentes en el agua residual de la planta, responsables de la degradación de la materia orgánica y evaluar su capacidad de remoción, se podría generar un ahorro en el proceso.

1.3 Objetivo general

Determinar la capacidad de la bacteria aislada en el laboratorio para la degradación de la materia orgánica, medida como DQO en el agua residual de la PTAR de un centro educativo.

1.4 Objetivos específicos

- 1.4.1 Aislar y caracterización una cepa bacteriana a partir de un cultivo comercial.
- 1.4.2 Realizar muestreos compuestos y simples del influente y efluente de la PTAR del centro educativo.
- 1.4.3 Analizar los parámetros de fósforo, sólidos suspendidos totales (SST) y DQO del agua residual de la PTAR del centro educativo.
- 1.4.4 Determinar la eficiencia de remoción de la materia orgánica empleando la cepa bacteriana aislada y caracterizada en el laboratorio, utilizando diferentes concentraciones del agua residual.

CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO

La calidad del agua se determina mediante la caracterización física y química de muestras de agua y su comparación con normas y estándares de calidad. De esta forma se puede identificar si el agua es idónea para los requerimientos de calidad asociados a un uso determinado, como por ejemplo el consumo humano o el ambiente, y en su caso, los eventuales procesos de depuración requeridos para la remoción de elementos indeseables o riesgosos. El deterioro de la calidad del agua ocurre por procesos tanto naturales como antrópicas. Se considera aguas residuales a todas aquellas aguas de composición variada provenientes de las descargas de usos público urbano, doméstico, industrial, comercial, de servicios, agrícola, pecuario, de las plantas de tratamiento y en general de cualquier otro uso, así como la mezcla de ellas (CONAGUA, 2016)

2.1 Características físicas de las aguas residuales

2.1.1 Temperatura

La temperatura juega un papel vital en el medio ambiente en que se encuentra la bacteria, lo cual también es sumamente importante para otras especies microscópicas. De acuerdo con el intervalo de temperatura en el cual la bacteria tiene su máximo desarrollo, las bacterias pueden ser clasificada como: criofílicas, mesofílicas y termofílicas. La temperatura del agua es un parámetro muy importante dada su influencia, tanto sobre el desarrollo de la vida acuática como, sobre las reacciones químicas y velocidades de reacción, así como la aptitud del agua para ciertos usos. Por otro lado, el oxígeno es menos soluble en agua caliente que en agua fría. El aumento en las velocidades de las reacciones químicas que produce un aumento de la temperatura, combinado con la reducción del oxígeno presente en las aguas superficiales, es causa frecuente del agotamiento de las concentraciones de oxígeno disuelto durante los meses de verano (Metcalf L. y Eddy H. , 1996).

2.1.2 Sólidos suspendidos totales

Los sólidos y sales disueltas pueden afectar adversamente la calidad de un cuerpo de agua, un efluente o un proceso de varias formas, en plantas potabilizadoras, por ejemplo, el análisis de sólidos disueltos es importantes como indicadores de la efectividad de procesos de tratamiento del agua.

2.2 Constituyentes inorgánicos no metálicos

2.2.1 pH

El pH en el agua es determinante en el desarrollo y crecimiento de los microorganismos. La mayoría de las bacterias pueden tolerar ambientes de pH mayor a 9.5 o menor a 4.0, pero el rango óptimo de pH para que las bacterias comunes cumplan apropiadamente sus funciones es de 6.5 a 7.5. El pH de los sistemas acuosos puede medirse convenientemente con un potenciómetro. Para el mismo procedimiento de medición también se emplean soluciones indicadoras y papeles de pH que cambian de color a determinados valores del pH, el color de la solución o del papel se compara entonces con el color de series normalizadas. (Metcalf L. y Eddy H. , 1996)

2.2.2 Fósforo en agua residual

El fósforo también es esencial para el crecimiento de algas y otros organismos biológicos. Debido a que en aguas superficiales tienen lugar nocivas proliferaciones incontroladas de algas, es de mucho interés limitar la cantidad de compuestos de fósforo que alcanzan las aguas superficiales por medio de vertidos de aguas residuales domésticas, industriales, y a través de las escorrentías naturales. Como ejemplo se puede citar el caso de las aguas residuales municipales, cuyo contenido en fósforo como PO_4^{2-} puede variar entre 4 y 15 mg/L. Las formas más frecuentes en las que se presenta el fósforo en soluciones acuosas incluyen el ortofosfato, el polifosfato y los fosfatos orgánicos. Los ortofosfatos, por ejemplo, se hallan disponibles para el metabolismo biológico sin que sea precisa una ruptura posterior. Los ortofosfatos incluyen las moléculas con dos o más átomos de fósforo, átomos

de oxígeno y, en determinados casos, átomos de hidrógeno combinados en moléculas complejas. La hidrólisis de las polifosfatos, proceso en el que recuperan sus formas como ortofosfatos, tiene lugar en soluciones acuosas. No obstante, esta hidrólisis suele ser un proceso bastante lento. El fósforo orgánico es de poca importancia en la mayor parte de los residuos domésticos o puede ser un constituyente importante en los vertidos industriales y fangos de aguas residuales domésticas.

La determinación de ortofosfato puede llevarse a cabo añadiendo directamente alguna sustancia que origine un complejo coloreado con el fosfato, como puede ser el caso del molibdato amónico. Antes de determinar la cantidad de polifosfatos y fosfatos orgánicos siguiendo el método parecido, es preciso convertirlos a polifosfatos, operación que se lleva a cabo con un proceso de digestión en medio ácido. (Metcalf L. y Eddy H. , 1996).

2.3 Constituyentes orgánicos

2.3.1 Demanda bioquímica

La demanda biológica de oxígeno determinada a los 5 días (DBO_5 o DBO) es un parámetro que mide la cantidad de oxígeno requerida por los microorganismos para la oxidación de la materia orgánica presente en el agua. Los microorganismos (principalmente bacterias) consumen oxígeno para metabolizar dicha materia orgánica. Cuanto mayor sea el contenido en materia orgánica a metabolizar, mayor será el requerimiento de oxígeno y, por tanto, mayor la DBO. Los microorganismos presentes en el agua residual no solamente son capaces de metabolizar la materia orgánica sino también distintos componentes inorgánicos, como el amoníaco, y por lo tanto este también contribuye al requerimiento de oxígeno.

La oxidación biológica es un proceso lento, cuya duración es, en teoría, infinita. En los 5 días que dura el ensayo, se llega a oxidar entre el 60 y 70% de la materia carbonosa (en un período de 20 días se completa la oxidación del 95 al 99%). Se asume la temperatura de 20°C como un valor medio representativo de la

temperatura que se da en los cursos de agua que circulan a baja velocidad en climas suaves. (Metcalf L. y Eddy H. , 1996).

La DBO fue uno de los primeros métodos utilizados en la determinación del contenido en materia orgánica, pero continúa utilizándose en la actualidad no sólo para determinar la cantidad aproximada de oxígeno requerido biológicamente para estabilizar la materia orgánica presente, sino también para determinar el tamaño de las instalaciones de tratamiento, medir la eficiencia de algún proceso de tratamiento o medir la biodegradabilidad de una muestra de agua residual.

2.3.2 Demanda química de oxígeno

La demanda química de oxígeno (DQO) es el método tradicional que reemplaza a los microorganismos y su uso del oxígeno con el uso de un reactivo oxidante fuerte, el $K_2Cr_2O_7$ y H_2SO_4 a alta temperatura. Como la cantidad de dicromato que reacciona está relacionada a la cantidad de oxígeno necesaria para consumir la materia orgánica, puede estimarse el oxígeno que se consumiría junto con la materia orgánica y ello en un tiempo de 90 minutos a 3 horas en lugar de 5 días, por lo que es mucho más práctico para controlar un proceso de tratamiento de agua. La determinación de la DQO es necesaria para los balances de masa en el tratamiento de aguas residuales. El contenido de DQO se puede subdividir en fracciones útiles para el análisis y diseño de los procesos de tratamiento. La determinación de la DQO soluble y la suspendida es muy útil. (Damir Brdjanovic, 2008)

2.4 Tratamiento de aguas residuales

Desde el inicio de las primeras civilizaciones que se implantaron en las diversas culturas que hoy en día conocemos; el agua, es un recurso fundamental para el origen de la vida y la persistencia de esta. Desde ocuparla para el consumo humano, hasta su utilización para la agricultura y la construcción. Con el paso del tiempo, el número de habitantes de una zona determinada fue aumentando y con ello la demanda de agua, pero ¿qué sucedía con el agua que desechaban los habitantes? ¿A dónde se vertía? ¿Cómo sabían que el agua estaba limpia o lista para su

consumo?, fueron interrogantes que; el tiempo, la necesidad y la enfermedad respondieron paulatinamente.

Fue en el siglo XIX cuando la demanda de desechos pluviales alcanzo su máximo auge, las calles de las ciudades europeas se percibían por el pútrido olor que tenían sus acequias (canaletas hechas de concreto y a cielo abierto, en el cual los desechos se movían), estas estaban elaboradas con muy poca pendiente y sin seguir ningún método; motivo por el cual los residuos fecales se recogían en estercoleros y generalmente eran vaciados y llenados a mano, transportados en los vehículos de la época. Tanta era el incremento de residuos que pronto las aguas de los pozos se contaminarían y al ser consumida por el humano, se desarrollarían grandes enfermedades causando epidemias por no saber cómo tratarlas y en su momento por no saber con exactitud de donde provenían. (Renneberg, 2008)

Los gobernantes de ese entonces propusieron, en primera instancia, el lavado de las acequias y las calles para eliminar el hedor y la suciedad, sin embargo, no contaban con el agua suficiente para realizar el trabajo.

Con ayuda de la tecnología y el ingenio se dio paso a un sistema de canales independientes (sistema radial), este sistema conducía el agua por medio de tubos de barro cocido y esmaltado, y se evacuaba fuera de la ciudad con ayuda de estaciones de bombeo con fuerza de vapor, hacia los llamados “campos de aguas residuales”, además de haber sacado lo sucio de la ciudad y ser una grandiosa obra realizada por la mano del hombre, los campos de aguas residuales fueron explotados para el uso agrícola. (Renneberg, 2008)

Pero, aun así, estos campos llegaron a su límite de llenado, suponiendo también su aumento en la superficie en las hectáreas que estos cubrían, además de que la agricultura ya no se podía desarrollar en esa zona.

Fue entonces que en 1905 se introduce la primera planta tratadora, esta debía descargar el agua de los campos de aguas residuales. Sin embargo, no fue hasta 1974 que se añadieron a estas tratadoras, las “cubetas de oxidación” que introducían oxígeno al agua estancada, obviamente para ayudar a los microorganismos aerobios. Fue hasta 1984 que se construyeron las primeras

plantas depuradoras de aguas residuales, y al darse cuenta de que podían depurar el agua por completo, los campos de aguas residuales se convirtieron en inútiles y pasaron a ser poco a poco en zonas de recreo (Renneberg, 2008).

2.4.1 Tratamiento biológico ¿Cómo funciona?

El principio del tratamiento biológico es darles comida a las bacterias para que realicen su actividad metabólica normal, porque “comen contaminación” para esto se tienen que dar ciertas condiciones, temperatura, pH, oxígeno, nitrógeno, por mencionar algunas.

El tratamiento biológico de las aguas residuales se inició, de un modo esencialmente empírico. La brecha tecnológica se abrió cuando se realizó que concentrando los microorganismos descomponedores de la materia orgánica que causa la contaminación biodegradable, se lograba la reducción de la contaminación en un corto tiempo, si se efectuaba en condiciones controladas (Jaramillo, 2013).

En los procesos naturales, los solutos se eliminan principalmente por descomposición, por lo general oxidación, metabolismo microbiano y conversión en materias microbianas celulares. Los procesos intensificados a gran escala poseen un mecanismo adicional de remoción, por medio del cual los contaminantes se absorben y aglomeran con las demás masas microbianas que se utilizan. La manera en que cada uno de estos procesos contribuye al efecto total de purificación dependerá del sistema de tratamiento que se use, su manera de operación y de las materias presentes en el agua residual en tratamiento (Winkler, 1999).

Una vez que cumplen esta primera función, siguen viviendo en el agua, comiéndose la suciedad, formando un lodo que puede volver a servir para depurar o puede terminar convertido en abono si hay exceso. Mientras, el agua sigue su camino, tras la decantación hacia la naturaleza.

2.4.2 Los microorganismos y el agua

Los microorganismos siempre se encuentran presentes en el agua, ya que la requieren para la constitución de su núcleo o de su membrana y demás material

orgánico del que está hecho el organismo. Cuando se desinfecta el agua, los microorganismos mueren o se inactivan temporalmente, pero una vez que se termina la acción del agente desinfectante, éstos crean las condiciones para nuevamente crecer y multiplicarse. Algunas especies son patógenas causantes de enfermedades, pero la gran mayoría no solo no son perjudiciales, si no que realizan procesos que sustentan la vida, son parte de los organismos superiores o de mayor complejidad y siempre han convivido con nosotros.

Aunque su división y separación taxonómica de los diferentes grupos de bacterias es difícil de establecer y en algunas ocasiones contradictoria. Los microorganismos como un todo tienen las siguientes generalidades:

1. Requieren de una fuente de energía para crecer, vivir y desarrollarse. Esta fuente de energía puede ser la energía solar, la energía producida en una reacción química con sustancias inorgánicas, o la energía que proporcionan algunas moléculas como: celulosa, grasas, azúcares, carbohidratos, proteínas, vitaminas, etc. Sin energía la vida no puede existir y si los microorganismos no disponen de ella, mueren o se conservan inactivos en estado latente.
2. Requieren de nitrógeno, y pueden adquirirlo del nitrógeno atmosférico, o nitrógeno en alguna forma química inorgánica como: amoníaco, nitritos, nitratos, o también la fuente puede ser el nitrógeno orgánico de proteínas o ácidos nucleicos.
3. Una fuente de carbono, que puede ser suministrado por el dióxido de carbono, el metano o por cadenas orgánicas de mayor complejidad que tienen en su estructura átomos de carbono, como por ejemplo los carbohidratos.
4. Una fuente de oxígeno, si los microorganismos son aerobios o ausencia del mismo si son anaerobios. Cabe señalar que existen microorganismos que tienen la capacidad de proliferar en ambientes que tengan o no presencia de oxígeno, es decir, aerobios facultativos.

5. También requieren de algunos nutrientes como: calcio, sodio, potasio, fósforo, magnesio y azufre.
6. Algunos minerales son esenciales para ciertos tipos de bacterias. Hierro, zinc, cobalto, y otros metales en cantidades traza son necesarios para los microorganismos.
7. Y, como ya lo habíamos mencionado con anterioridad, requieren de agua y no pueden sobrevivir sin ella, sin embargo, algunos microorganismos como los que se reproducen por esporas (CONAGUA, 2016) pueden estar en estado latente, inactivos durante largos periodos, para nuevamente regresar a su actividad cuando las condiciones les son favorables.

En pocas palabras, podríamos definir que el tratamiento biológico de las aguas residuales se basa en la función natural de las bacterias para cerrar los ciclos elementales (por ejemplo, de C, N y P) en la tierra (Damir Brdjanovic, 2008).

2.4.3 La labor de los microorganismos

El tratamiento biológico de aguas residuales se basa en el proceso donde una población mixta de microorganismos utiliza como nutrientes sustancias que contaminan el agua. Las aguas residuales que contienen solutos contaminantes están en contacto con una población de microorganismos apropiados, durante un tiempo suficiente que permita descomponer y eliminar, según se desee, los solutos contaminantes (Winkler, 1999).

Las bacterias utilizan la materia orgánica disuelta y en suspensión en forma coloidal, para sobrevivir en el ambiente en que se encuentran. Al consumir esta materia cuyo principal componente es el carbono, una parte de ella la convierten en tejido celular y otra parte es emitida al medio ambiente en forma de gases. Los gases producidos, en su mayor parte, pueden separarse en forma espontánea del agua tratada y el tejido celular formado, se separa también de la masa de agua por sedimentación, por lo que cuando esto ocurre se dice que la materia orgánica ha sido removida del agua tratada.

En este proceso en que los diferentes microorganismos consumen el sustrato en su propio beneficio, remueven el material orgánico presente en las aguas residuales y lo transforman en nuevas células y en gases inocuos que se emiten a la atmósfera, limpiando el agua de la materia orgánica disuelta originalmente presente.

2.5 Identificación de bacterias

2.5.1 Tinción de Gram

La tinción de Gram fue desarrollada por el bacteriólogo danés Hans Christian Gram en 1884 y es uno de los procedimientos de tinción más útiles porque permite clasificar las bacterias en dos grandes grupos: Gram positivas y Gram negativas.

La tinción requiere cuatro soluciones un colorante o tinte básico, un mordiente (sustancia que incrementa la afinidad entre la célula y el tinte), un decolorante (elimina el tinte de una célula teñida) y un segundo tinte o colorante de contraste (tinte de color diferente a la inicial). Tras la tinción con el primer colorante (Cristal violeta) se efectúa una decoloración con etanol que arrastrará al colorante sólo en las Gram negativas, mientras que en las Gram positivas el colorante queda retenido y las células permanecerán azules. Las células Gram negativas se teñirán después con el colorante de contraste (safranina) para que puedan observarse.

El colorante violeta y el yodo se combinan en el citoplasma de cada bacteria y lo colorean de violeta oscuro o púrpura. Las bacterias que conservan este color después de haberles agregado el alcohol para decolorarlas se clasifican como Gram positivas; las bacterias que pierden el color violeta oscuro después de la decoloración se clasifican como Gram negativas (Gerard J. tortora, 2007).

El método de Gram es una de las técnicas de técnicas más importantes en microbiología médica pero sus resultados no pueden aplicarse de modo universal porque algunas células bacterianas se tiñen de modo deficiente o no se tiñen. Los resultados de la tinción de Gram son más uniformes cuando se la utiliza en bacterias jóvenes, en etapa de crecimiento (Gerard J. tortora, 2007).

2.5.2 Pruebas bioquímicas

Las pruebas bioquímicas consisten en distintas pruebas químicas para aplicar en medios biológicos en los cuales es conocida su reacción, nos permite identificar distintos microorganismos presentes. Su funcionamiento generalmente consiste en determinar la actividad de una vía metabólica a partir de un sustrato que se incorpora en un medio de cultivo y que la bacteria al crecer incorpora o no.

Se emplean para identificar de forma clara y precisa, la presencia o ausencia de una enzima, de un grupo de enzimas, o de una vía metabólica completa en uno o más microorganismos. Son empleadas principalmente la identificación y clasificación de bacterias y hongos.

2.5.3 Caldo rojo de fenol

El medio de prueba contiene proteínas, un solo hidrato de carbono, un indicador del pH y un tubo de Durham invertido para la captación de gas. Las bacterias que se inoculan en el interior del tubo pueden utilizar las proteínas o el hidrato de carbono como fuentes de carbono y energía. Si las bacterias catabolizan el hidrato de carbono y producen ácido, el indicador de pH cambia de color. En algunos microorganismos el catabolismo de los hidratos de carbono genera gas además de ácido. La presencia de una burbuja en el tubo de Durham refleja la formación de gas (Gerard J. tortora, 2007).

2.5.4 Citrato de Simmons

Agar Citrato de Simmons se utiliza para diferenciar bacilos entéricos Gram negativos en base al citrato de sodio como fuente de carbono y a la sal de amonio inorgánica como fuente de nitrógeno. Se recomienda para la diferenciación de coliformes aislados del agua y muestras clínicas.

El sulfato de magnesio es un cofactor para diversas reacciones metabólicas. El cloruro de sodio mantiene el equilibrio osmótico. El fosfato dipotásico actúa como un sistema tampón. El azul de bromotimol es un indicador de pH. El dihidrógenofosfato de amonio es la única fuente de nitrógeno. El citrato de sodio es la única fuente de carbono. El agar bacteriológico es el agente solidificante.

Solo los organismos capaces de utilizar citrato como fuente de carbono crecen y producen un cambio de color de verde a azul (alcalino), mientras que cuando no se utiliza citrato (prueba negativa), el color del medio permanece igual (Ewings, 1972).

2.5.6 Medio SIM

Medio semisólido destinado a verificar la motilidad, producción de indol y de sulfuro de hidrogeno por los microorganismos. En este medio de cultivo la tripteína y la peptona aportan nutrientes para el crecimiento bacteriano. El triptófano es un aminoácido constituyente de muchas peptonas y particularmente de la tripteína y puede ser metabolizado por algunas bacterias para producir indol. En el proceso intervienen un conjunto de enzimas llamadas triptofanasa. El indol producido se combina con el aldehído del reactivo de Kovács para originar un compuesto color rojo. El agar es un agente solidificante que, para este caso, su concentración permite que el medio sea semi sólido, condición necesaria para detectar movilidad, que se evidencia por la turbidez del medio o el crecimiento que se difunde más allá de la línea de siembra del microorganismo en estudio (Ewing, 1986).

2.5.7 Prueba agar almidón

Los polisacáridos, como el almidón son demasiado largos para ser transportados al interior de la célula. Los microorganismos excretan amilasas que hidrolizan esos polímeros hasta oligo o mono sacáridos que pueden usarse como sustratos para crecer.

2.5.8 Prueba de caldo urea

La urea es una fuente de nitrógeno para aquellos organismos que producen ureasa. El extracto de levadura es una fuente de vitaminas, particularmente del grupo B, esencial para el crecimiento bacteriano. Los fosfatos de potasio proporcionan una capacidad de amortiguación. El rojo fenol es el indicador de pH. Cuando los organismos utilizan urea, se genera amoníaco durante la incubación, lo cual hace que la reacción de estos medios sea alcalina. Los tubos ureasa positivos hacen que el indicador de fenol tome un color rojo oscuro-violáceo (alcalinización). Así es como la producción de ureasa puede detectarse mediante un cambio en el indicador rojo fenol (Rustigian and Stuart. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 47:109).

2.5.9 Prueba de la catalasa

La catalasa es una enzima presente en algunos microorganismos, que tiene la capacidad de descomponer el agua oxigenada (H_2O_2) en agua y oxígeno. El desprendimiento de burbujas indica una prueba positiva. Principalmente utilizada para diferenciar entre los géneros. (MacFaddin)

CAPÍTULO 3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

El presente trabajo se realizó en los laboratorios LQ4, LQ5 y Laboratorio de Análisis Industriales de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería.

El trabajo se realizó en tres etapas:

En la primera etapa, se realizó la identificación y caracterización de una bacteria, que, se cree, es capaz de degradar materia orgánica presente en las aguas residuales, es la punta de lanza de este proyecto. En esta etapa se realizaron las siguientes actividades: cultivos, pruebas bioquímicas y se estudiaron las condiciones óptimas de crecimiento (pH, temperatura, nutrientes y condiciones de oxigenación).

En la segunda etapa, se caracterizaron las aguas residuales de la planta de tratamiento de un centro educativo, con el fin de evaluar la calidad del agua tratada con base en la normatividad mexicana aplicable vigente, para lo cual se analizó el influente (agua residual no tratada) y el efluente (agua residual tratada) de la misma. Los parámetros analizados fueron: fósforo total, sólidos suspendidos totales, demanda química de oxígeno, pH, conductividad y temperatura.

En una tercera etapa, se evaluó el desempeño de la bacteria aislada y caracterizada para la remoción de materia orgánica, expresada como DQO. Este experimento se realizó en matraces cerrados, con agitación y temperatura ambiente. El agua residual utilizada se tomó de la PTAR estudiada.

El desarrollo experimental se resume en la figura 1.

Fig. 1. Esquema de desarrollo experimental.

3.1 Materiales

➤ **Métodos microbiológicos**

Matraz Erlenmeyer de 250 mL, Cajas Petri de vidrio, asa bacteriológica, mechero, aspersor de líquidos, bolsas de poli papel Gasas, vela, porta objetos, tubos de ensayo Campanas de Durham.

➤ **Métodos analíticos**

Matraz volumétrico, pipeta volumétrica, probeta, matraz Erlenmeyer, filtros fibra de vidrio, crisoles, pinzas para crisol, matraz Kitasato y vasos de pp.

• **Degradación de la materia orgánica**

Matraz volumétrico, pipetas graduadas, cajas petri de vidrio, probeta graduada, mechero, vidrio de reloj, tapones de gasa.

• **Muestreo**

Frascos de vidrio o de pet con tapa, pipeta graduada, equipo de protección personal.

3.2 Equipos

➤ **Métodos microbiológicos**

Autoclave, campana de flujo laminar. balanza analítica, incubadora, desecador sin sílice limpio y microscopio óptico.

• **Métodos analíticos**

Balanza analítica, estufa, espectrofotómetro HACH DR 2000, termo reactor HACH, bomba de vacío, mufla, desecador, parrilla de calentamiento.

• **Degradación de la materia orgánica.**

Balanza analítica, campana con luz ultravioleta, autoclave, refrigerador, incubadora y Shaker.

- **Muestreo**

Potenciómetro PC 18 y Termómetro de mercurio.

3.3 Reactivos

- **Métodos microbiológicos**

Agua destilada, agar nutritivo (AN), alcohol etílico, caldo nutritivo (CN), safranina, reactivo de yodo-lugol, cristal violeta, solución de alcohol-cetona, aceite de inmersión, indicador rojo de fenol, glucosa, lactosa, sacarosa, manitol, medio citrato de Simmons, medio Sim, agar almidón, caldo urea, peróxido de hidrogeno y ácido clorhídrico.

- **Métodos analíticos y muestreo**

Biftalato de potasio, agua destilada, dicromato de potasio, sulfato mercúrico, sulfato de plata, ácido sulfúrico, agua destilada, fosfato monobásico de potasio anhidro, fenolftaleína, persulfato de amonio, hidróxido de sodio, ácido nítrico, glicerol, cloruro estanoso di hidratado, heptamolibdato de amonio tetra hidratado y ácido sulfúrico al 98%.

- **Degradación de la materia orgánica**

Sulfato de amonio, fosfato básico de potasio ácido cítrico, sulfato de magnesio hepta hidratado, sulfato de manganeso, cloruro de calcio, sulfato de hierro hepta hidratado, agua destilada, fosfato dibásico de potasio y agar nutritivo.

3.4 Preparación reactivos microbiológicos (medios de cultivo)

Las preparaciones de los medios de cultivo se realizaron en condiciones asépticas, empleando mecheros y/o campana de flujo laminar.

- **Agar nutritivo**, e preparó según las indicaciones del fabricante MCDLAB, con numero de lote: 714119C001, esterilizando a 121°C durante 15 min. El medio se colocó en cajas de Petri, en campana de extracción para su solidificación.

- **Caldo nutritivo con indicador rojo fenol y diferentes fuentes de carbono (sacarosa, glucosa, lactosa y manitol).** Los caldos se prepararon 4 matraces según las indicaciones del fabricante DIBICO con numero de lote: 9387051, donde compartían la base nutritiva con el indicador, pero con las diferentes fuentes de carbono que se fueron agregando en proporción del medio, se coloraron en tubos de ensayo con campana Durham, esterilizando a 121°C durante 15 min.
- **Agar citrato de Simmons,** se preparó según las indicaciones del fabricante, DIBICO con numero de lote: 9247011, esterilizando a 121°C durante 15 min. El medio se colocó en tubos de ensayo y se incubaron a 35 °C durante aproximadamente 24 h en posición inclinada.
- **Medio Sim** se preparó siguiendo las indicaciones del fabricante BD Bioxon con numero de lote: 4252947, esterilizando a 121°C durante 15 min. El medio se colocó en los tubos de ensayo para su solidificación en posición vertical.
- **Agar almidón** se preparó según las indicaciones del fabricante, esterilizando a 121°C durante 15 min. El medio se colocó en cajas de Petri para su solidificación.
- **Caldo Urea** se preparó siguiendo las indicaciones del fabricante, para esterilizar el medio se filtró a través de una membrana de 25 μ . El medio se colocó en tubos de ensayo los cuales previamente fueron esterilizados en autoclave.
- **Crecimiento en medio ácido.** Para esta prueba se preparó agar nutritivo a un pH de 4.2. Para alcanzar este pH se utilizó una solución de ácido clorhídrico al 0.5 N. El medio se esterilizó a 121°C durante 15 min. El medio se colocó en cajas de Petri para su solidificación.

3.5 Procedimiento

3.5.1 Métodos microbiológicos. Aislamiento y caracterización de la bacteria

3.5.1.1 Aislamiento cepa

Para iniciar con la investigación, se aisló y caracterizó la bacteria a partir de un cultivo puro. La bacteria fue aislada en agar nutritivo por la técnica de estriado en placa, incubadas a 37°C durante 24 h.

3.5.1.2 Tinción de Gram

En área aséptica se realizó un frotis de la bacteria aislada en el agar nutritivo y enseguida se continuó con la tinción. Se coloraron unas gotas de cristal violeta y se dejó reposar por un minuto, se enjuagó con agua destilada y se continuó con la adición de unas gotas de yodo lugol, se dejó reposar por un minuto, se enjuagó con agua destilada y se continuó con la adición de una solución de alcohol-cetona, para finalizar la tinción, se agregaron gotas de safranina dejando reposar un minuto, finalmente se enjuagó con agua destilada. Posteriormente se observó la tinción en el microscopio, utilizando aumentos x10, x40 y x100. Para este último aumento se usó el aceite de inmersión para evitar dañar el lente.

3.5.1.3 Pruebas bioquímicas

3.5.1.3.1 Caldos con indicador rojo de fenol

La base de caldo rojo fenol es un medio sin carbohidratos agregados que se utiliza como base para la adición de los carbohidratos para determinar las reacciones de fermentación de los microorganismos. Para esta prueba se utilizaron caldos con diferentes fuentes de carbono (glucosa, sacarosa, lactosa y manitol). En cada uno de los caldos se inoculó, con ayuda de un asa de siembra, una colonia aislada en A.N. Se incubaron a 35 °C durante de 24 h (Ewing, 1986).

3.5.1.3.2 Prueba citrato de Simmons

Esta prueba determinar si el microorganismo es capaz de emplear el citrato (citrato permeasa) como única fuente de carbono. Con un asa de siembra, se tomó una colonia aislada en agar nutritivo y se inoculo en el medio de citrato de Simmons, incubando a 35 °C durante 24 h.

3.5.1.3.3 Prueba en medio SIM

Se utiliza para determinar la producción de sulfuro, formación de indol y movilidad de los microorganismos entéricos. La prueba se realizó por la técnica de picadura (punción). Una colonia aislada en A.N. se inoculó en el medio SIM y se incubó a 35 °C durante 24 h.

3.5.1.3.4 Prueba de agar almidón

Esta prueba tiene la finalidad de determinar si el microorganismo tiene la enzima amilasa. La bacteria aislada en agar nutritivo se inoculó en el medio agar-almidón y se llevó a incubación a 35°C durante 24 h. Finalizado este tiempo de incubación y observándose colonias bien definidas, se adicionaron unas gotas de yodo-lugol directo en las cajas.

3.5.1.3.5 Prueba de la urea

Con esta prueba se identifica si el microorganismo posee la enzima ureasa (utiliza la urea como fuente de nitrógeno). De la bacteria aislada en agar nutritivo se realizó una suspensión, de esta suspensión se tomaron 2 asadas y se inocularon en el medio caldo Urea incubando a 37°C durante 24 h.

3.5.1.3.6 Prueba de la catalasa

Con esta prueba se puede identificar la presencia de la enzima catalasa. En portaobjetos se colocó, una con ayuda de un asa de siembra una pequeña cantidad de la colonia aislada en agar nutritivo y se adicionaron unas gotas de peróxido de hidrógeno.

3.5.1.3.7 Crecimiento en medio ácido

La prueba se realizó inoculando una muestra de la bacteria aislada en agar nutritivo en agar nutritivo a pH ácido (4.2), incubando a 37 °C por 24 h.

3.5.1.3.8 Prueba de anaerobiosis

La prueba se realizó en cajas Petri con agar nutritivo inoculadas con una muestra de la bacteria aislada en agar nutritivo. Las cajas Petri fueron colocadas dentro de un desecador limpio, seco, sin la sílica-gel, dentro del desecador se colocó una vela encendida y con mucho cuidado se cerró el desecador. Se esperó a que la vela se

apagara, esto por la acción del consumo total del oxígeno. Una vez que se terminó este procedimiento se incubo por 24 h a una temperatura de 37 °C.

3.5.2 Métodos analíticos. Caracterización de las aguas residuales de la PTAR del centro educativo

Para la caracterización del agua residual de la PTAR, se realizaron muestreos simples y compuestos durante 1 mes, analizando los siguientes parámetros físicos y químicos: sólidos suspendidos (SCFI, 2015), demanda química de oxígeno, (SCFI, 2001), fósforo total (SCFI, 2001), pH (SCFI, 2016) y conductividad.

3.5.2.1 Muestreo

Se realizaron tres muestreos compuestos y tres muestreos simples en diferentes días. La toma de muestras para el análisis del agua residual se realizó en el influente (entrada a la PTAR) y el efluente (salida de la PTAR) de la planta de tratamiento del centro educativo.

Para realizar el muestreo, se lavaron los recipientes tres veces con el agua que fue colectada. Una vez lavados los recipientes se colectaron las muestras del influente y efluente de la PTAR del centro educativo y se etiquetaron los recipientes con la siguiente información: punto de muestreo, fecha y hora. Durante el muestreo se midieron los parámetros de pH y temperatura. En el laboratorio se preservaron las muestras para análisis de DQO, con ácido sulfúrico concentrado a pH 2 y se guardaron en el refrigerador a una temperatura de 4°C.

3.5.2.2 Demanda química de oxígeno (DQO). Método refluo cerrado

- **Curva de calibración**

A partir de una solución madre de biftalato de potasio de 1000 ppm se preparó una curva de calibración considerando seis puntos de concentración: 80, 120, 200, 400, 600 y 1000 ppm.

- **Digestión**

En diferentes tubos de digestión se colocaron 2.5 mL de las soluciones estándar para la curva de calibración, muestras y 2 blancos de agua destilada, 1.5 mL de la

solución de digestión A y 3.5 mL de la solución de sulfato de plata-ácido sulfúrico. Se taparon los tubos y se mezclaron para su homogenización. Cada uno de los tubos se colocaron dentro del reactor, previamente calentado hasta los 150 °C durante dos horas, cuando termino el tiempo de digestión, se enfriaron los tubos a temperatura ambiente, se limpiaron con agua destilada y papel absorbente.

- **Lectura de la absorbancia**

Por último, se leyeron las absorbancias en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 nm. Con los datos obtenidos se construyó la curva de calibración y a su vez, con la curva de calibración se calcularon los mg/L de DQO utilizando la ecuación:

Ecuación No. 1

$$y = mx + b$$

Donde:

y = absorbancia,

x= concentración,

m = pendiente y

b = ordena al origen

3.5.2.3 Solidos suspendidos totales

- **Preparación de los filtros Gooch**

Con la ayuda de unas pinzas se colocó un filtro de fibra de vidrio dentro de los filtros Gooch, (SCFI, 2015) procurando que el filtro cubriera muy bien los orificios. Los filtros preparados, se llevaron a la estufa a una temperatura de 105 °C durante 30 minutos, después se colocaron cuidadosamente en un desecador y se dejaron 30 minutos. Una vez transcurrido este tiempo se pesaron y se registró el peso. Este

procedimiento se realizó hasta que se obtuvo una diferencia $\leq 0,0005$ g en dos pesadas consecutivas.

- **Análisis de las muestras**

Con ayuda de la bomba de vacío se filtraron 25 mL de cada una de las muestras en los filtros Gooch preparados previamente. Al finalizar el filtrado de todas las muestras, se colocaron en la estufa a una temperatura de 105 °C durante una hora, después se mantuvieron 30 minutos en el desecador. Una vez transcurrido este tiempo se pesaron y se registró el peso. Este procedimiento se realizó hasta que se obtuvo una diferencia $\leq 0,0005$ g en dos pesadas consecutivas.

Los SST fueron calculados con la siguiente ecuación:

Ecuación No. 2
$$\frac{mg}{L} SST = \left(\frac{A-B}{V} \right) * 1x10^6$$

Donde:

SST= sólidos suspendidos totales

A= es el peso del filtro con muestra

B= el peso del filtro sin la muestra

$1x 10^6$ = factor de conversión

V= volumen de muestra filtrada

3.5.2.4 Fósforo total

- **Curva de calibración**

Se realizó una curva de calibración para un intervalo de trabajo de 0.03 a 1 mg/L de fósforo. En matraces volumétricos de 100 ml se prepararon 5 disoluciones estándar a partir de una solución madre de 50 ppm.

- **Digestión de la muestra**

Preparación de la muestra por medio de la digestión con persulfato de amonio, en un vaso de precipitado se colocaron 50 mL de la muestra bien mezclada, se adicionó 1 mL de disolución de ácido fuerte y 0.4 g de persulfato de amonio, se llevó a la parrilla de calentamiento y cuando comenzó a hervir, se dejó aproximadamente 40 minutos, hasta que el volumen inicial se redujo a 10 mL. Enseguida se diluyó con agua destilada hasta 30 mL, se adicionó una gota de fenolftaleína y se tituló con hidróxido de sodio 6 N hasta que apareciera un color rosa pálido. Después se aforó a 100 mL con agua destilada.

- **Desarrollo de color**

Para el desarrollo del color de las muestras, soluciones estándar y blanco de agua destilada se adiciono, agitando fuertemente después de cada adición, 2 mL de disolución de heptamolibdato de amonio tetra hidratado y 5 gotas de disolución de cloruro estanoso. Después de 10 minutos de reacción se realizó la lectura de la absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 690 nm.

Con la curva de calibración se calcularon los mg/L de P utilizando la ecuación No. 1.

3.5.3 Determinación de la capacidad de remoción de la DQO con la cepa aislada

3.5.3.1 Obtención de la biomasa

Con ayuda del asa de siembra, previamente esterilizada al mechero, se tomó una muestra de la bacteria aislada y se inoculó en cada una de las cajas Petri con agar nutritivo por medio de la técnica de estría cruzada. Las cajas se incubaron a 37°C durante 24 h. Al transcurrir el tiempo de incubación se inocularon 4 asadas de una de las colonias desarrolladas en agar nutritivo y se colocaron en un matraz Erlenmeyer con caldo nutritivo, el matraz se colocó en el shaker a temperatura ambiente (17 °C aproximadamente) durante 24 h con una agitación continua a 200 rpm. Cuando finalizó este periodo se tomó 1 mL del medio inoculado y se resembró en un

segundo matraz con caldo nutritivo estéril, se colocó en el shaker durante 24 h, se tomaron 2.5 mL DQO a las 24 y 48 h de agitación.

3.5.3.2 Remoción de la materia orgánica

- **Medio mineral**

El medio mineral nutriente utilizado para el enriquecimiento de la cepa aislada se formuló con los reactivos que se presentan en la tabla 1. Una vez preparado el medio mineral se esterilizó con luz UV y se resguardo a temperatura de 2 °C.

Tabla 1. Composición del medio mineral nutriente.

Compuesto	g/100mL
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.4
K ₂ HPO ₄	0.53
KH ₂ PO ₄	0.64
Ácido cítrico	0.01
MgSO ₄ *7H ₂ O	0.04
MnSO ₄	0.005
CaCl ₂	0.04
FeSO ₄ *7H ₂ O	0.03

De la biomasa obtenida se tomó una alícuota de 6 mL y se inoculó en 48 mL de solución de medio mineral esterilizado, en un matraz Erlenmeyer, el matraz se colocó en el shaker a temperatura ambiente (17 °C aproximadamente) durante 48 h con una agitación continua a 200 rpm

Para evaluar el porcentaje de remoción de la MO medida como DQO se utilizaron las siguientes relaciones biomasa-agua residual: 25 %: 75 %, 50 %:50% y 75 % :25 %. Estas soluciones se prepararon en matraces Erlenmeyer los cuales se colocaron

en el shaker a 200 rpm durante 48 h. Para el análisis de DQO se tomaron muestras antes de la agitación, a las 24 y 48 h de agitación.

La eficiencia de remoción de la DQO fue calculada con la ecuación:

$$\text{Ecuación No. 3} \dots \%R = \frac{I_f - E_f}{I_f} * 100$$

CAPÍTULO 4. RESULTADOS

4.1 Aislamiento y caracterización de la cepa

4.1.1 Aislamiento de la cepa

Las colonias crecieron en el medio nutritivo después de 24 h de incubación, en algunas cajas inoculadas las colonias se veían definidas con una superficie irregular fig.2, mientras que, en otras, se observó un crecimiento extendido fig.3. Se observó que en aproximadamente 72 h, las colonias tendían a envejecer muy rápido, ya que se observaba un oscurecimiento a lo largo de las colonias fig.4.



Fig.2. Colonias definidas.



Fig.3. Crecimiento extendido.



Fig.4. Bacteria envejecida.

4.1.2 Tinción Gram

Esta tinción de nos indica la bacteria Gram positiva o negativa. Como se ilustra en la fig. 5 la bacteria aislada es un bacilo Gram positivo.

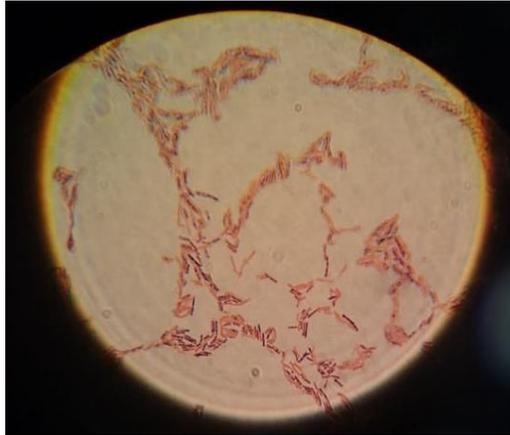


Fig. 5. Tinciones vistas en microscopio óptico lente X100.

4.1.3 Pruebas bioquímicas

Las pruebas bioquímicas realizadas para la caracterización de las colonias aisladas fueron las siguientes:

4.1.3.1 Caldos con indicador rojo de fenol

En esta prueba se observó crecimiento microbiano y cambio de color en el caldo con sacarosa, como se muestra en la fig. 6. Para el resto de los caldos no hubo cambio alguno en color o crecimiento de bacterias (figuras 7,8 y 9). Con estos resultados se demuestra que la bacteria aislada cataboliza la sacarosa produciendo ácido.



Fig. 6. Caldo sacarosa.



Fig. 7. Caldo con lactosa.



Fig. 8. Caldo glucosado.



Fig. 9. Caldo con manitol.

4.1.3.2 Caldo urea

En esta prueba se observó un crecimiento microbiano en el interior, sin cambio de color, fig. 10. Tras las 24 y 48 h posteriores a la siembra de la bacteria dentro del caldo de urea solamente mostro crecimiento en la parte superior de la superficie del medio, siendo poco respecto a la superficie de la boca del tubo de ensayo. Lo

anterior indica que la prueba negativa, es decir la bacteria no es capaz de hidrolizar la urea.



Fig. 10. Tubos con medio de urea.

4.1.3.3 Medio citrato de Simmons

A las 24 h de haber sembrado la muestra en el medio citrato de Simmons no hubo cambio alguno, ya sea de coloración o crecimiento. Fue hasta las 48 h que se vio la diferencia y un cambio de color en el medio, el cual fue de un de color verde a un color azul rey, además, se observó crecimiento de colonias muy pequeñas a lo largo de la asada, similares a las colonias que se desarrollaron en las cajas Petri con agar nutritivo (fig. 11). Con los resultados obtenidos podemos indicar que la bacteria aislada utiliza el citrato como como única fuente de carbono y energía.



Fig. 11. Prueba de citrato de Simmons a las 48 h.

4.1.3.4. Medio SIM

Después del tiempo de incubación de 24 h en el medio Sim, se observó crecimiento, tanto en la picadura como en la superficie y aproximadamente 1 cm por debajo de la superficie del medio, fig. 12, lo cual demuestra que el bacilo presenta motilidad.

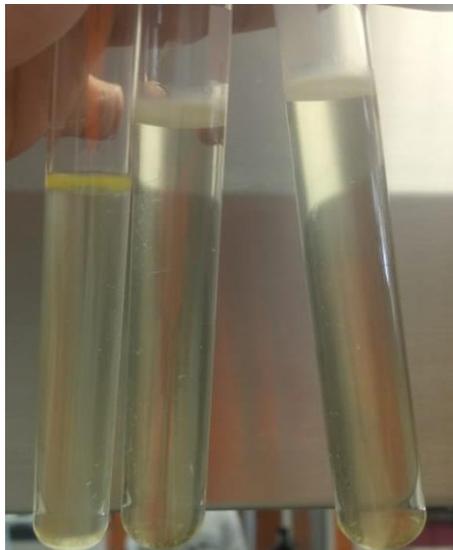


Fig. 12. Medio SIM con crecimiento.

4.1.3.5 Prueba de agar almidón

En la prueba del medio de agar almidón se observó crecimiento de colonias, a estas colonias se le realizó la prueba de yodo-lugol. Esta prueba dio un resultado positivo al observarse que no hubo un contacto directo del reactivo con las colonias, es decir, se observó un halo en medio que separa la colonia del reactivo de yodo, fig.13, lo que indicó que la cepa aislada tiene la capacidad de hidrolizar el almidón.

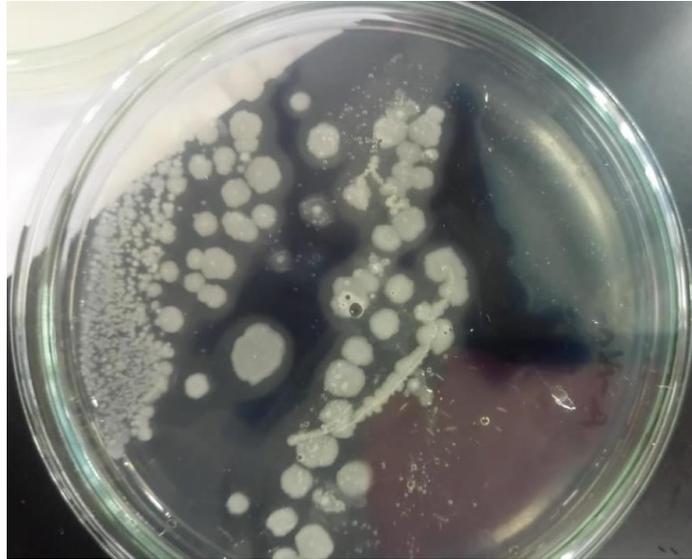


Fig. 13. Colonias con tincura de yodo.

4.1.3.6 Prueba de la catalasa

Despues de la adición de 2 a 3 gotas de peróxido de hidrógeno a la caja petri inoculada , inmediatamente hubo desprendimiento de burbujas fig. 14, las cuales indicaban perfectamente la descomposición del agua oxigenada en agua y oxígeno indicando una prueba positiva.



Fig. 14. Prueba catalasa positiva.

4.1.3.7 Prueba de Anaerobiosis

El objetivo de la prueba de anaerobiosis fue dejar sin oxígeno el ambiente y observar la posibilidad de crecimiento bacteriano. Después de haber inoculado la bacteria en las cajas se colocaron en una cámara de anaerobiosis fig.15. Los resultados fueron evidentes y se destaca la presencia de crecimiento de colonias uniformes fig.16; esto indicó que la bacteria aislada tuvo la capacidad de crecer en ambiente anaerobio. Con base a los resultados obtenidos en esta prueba y en la prueba de crecimiento en agar nutritivo se demostró que la bacteria aislada es una bacteria aerobia facultativa.



Fig. 15. Cámara de anaerobiosis con cajas en su interior.



Fig. 16. Crecimiento bacteriano en condiciones anaerobias.

4.1.3.8 Acidificación del medio nutritivo

Con base a los resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas se plantearon dos posibles especies del género *bacillus*: *subtilis* y *coagulans*, ambas especies de *bacillus* presentan características similares como: morfología en las colonias desarrolladas en el medio nutritivo, tinción de Gram (+), utilización del citrato y sacarosa como fuente de carbono, resultado positivo en la prueba de la catalasa y almidón y desarrollo en ambiente aerobio y anaerobio. Por esta razón se realizó una siguiente prueba en medio ácido con el objetivo de observar si la bacteria aislada se desarrollaba en este medio. Se elaboró un medio nutritivo a pH de 4.2, una acidez en la que no cualquier microorganismo puede crecer y que entre nuestros dos posibles bacilos solo uno crecería.

Después de la inoculación de la bacteria y su tiempo de 24 horas de incubación se observó crecimiento bacteriano en las placas de Petri, fig.17, por tal motivo nos hizo descartar a una bacteria: *bacillus subtilis*, ya que esta no tiene la cualidad de crecer en ambientes ácidos y *bacillus coagulans* si tiene la capacidad de crecer en ambiente ácido.



Fig. 17. Crecimiento bacteriano en medio nutritivo ácido.

4.2 Caracterización del agua residual PTAR

Los análisis físicos y químicos analizados para la caracterización de la PTAR fueron: conductividad, pH, sólidos, DQO y fósforo, parámetros importantes, desde diferentes puntos de vista como: protección ambiental, evaluación y control de la eficiencia de la PTAR, así como del cumplimiento de la normativa vigente.

4.2.1 Muestreo

En la tabla 5 se presentan los resultados de los parámetros físicos: temperatura, pH y conductividad analizados en cada uno de los muestreos (Foto 1).



Foto 1. Muestreo.

Con respecto al pH se observa que el valor promedio se encuentra dentro de los LMP del PROY-NOM-001- SEMARNAT -2021 los cuales son 6.5 a 8.5 unidades de pH. Cabe mencionar que la norma actual es la NOM-001- SEMARNAT -1966, no contempla como parámetro de control el pH, sin embargo, se comparó con la norma 2021 ya que está a punto de entrar en vigor. Adicional como parámetro de control de la PTAR se recomienda que las unidades de pH se encuentren en los valores de 6 a 9, ya que concentraciones inadecuadas del ion hidrógeno pueden causar dificultad en el tratamiento con procesos biológicos, como es el caso de la PTAR y también el efluente puede modificar el pH en las aguas naturales si está no se modifica antes de descargarse (Metcalf L. y Eddy H. , 1996).

Con respecto a la conductividad, los valores normales en aguas residuales urbanas oscilan en el rango de 500 a 1500 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Valores elevados de conductividad $>3.000 \mu\text{S}/\text{cm}$, podrían afectar el tratamiento biológico, impidiendo el desarrollo de una comunidad bacteriana estable, así también podrían desarrollarse las bacterias filamentosas que son más resistentes, lo que provocaría que se debilite la estructura flocular del lodo activo, disminuyendo su densidad y por tanto su velocidad de sedimentación. Como se observa en la tabla 2 los valores de conductividad en el agua residual de la PTAR, tanto en el influente como en el efluente se encuentran, incluso, por debajo de los valores antes mencionados, lo que nos indica que este parámetro es aceptable para el buen desempeño de la PTAR.

Tabla 2. Resultados de los parámetros físicos: temperatura, pH y conductividad.

Fecha	Hora	pH		Conductividad		Temperatura
		Influente	Efluente	Influente	Efluente	Efluente
10/09/2019	09:00	8.02	7.4	240	141	17
	13:00	8.18	7.63	229	282	29
	18:00	8.47	7.87	210	256	23
13/09/2019	13:00	8.94	9.06	367	643	23

12/09/2019	09:00	8.01	7.91	195	228	19
17/09/2019	09:00	7.93	s/caudal	192	s/caudal	23
	13:00	8.18	7.98	158	232	24
19/09/2019	13:00	8.33	8.11	131	250	26
20/09/2019	09:00	8.23	8.14	164	253	19
	13:00	8.27	8.07	153	255	25
Promedio		8.26	8.02	204	282	23

4.2.2 Sólidos suspendidos totales

Como ya se mencionó se monitoreo el contenido de sólidos suspendidos totales como control de la calidad del efluente, tomando como referencia la NOM-001, cuyo valor máximo permitido es de 125 mg/L^{-1} . Los resultados se encontraron dentro de los límites permitidos por la norma, por otro lado es importante controlar los SST como control de buen desempeño de la PTAR, ya que cuando se tienen flóculos bien formados la sedimentación se facilita dando lugar a un sobrenadante limpio (Kretschmar y Manefield, 2015). En la fig. 18 se presentan los resultados.

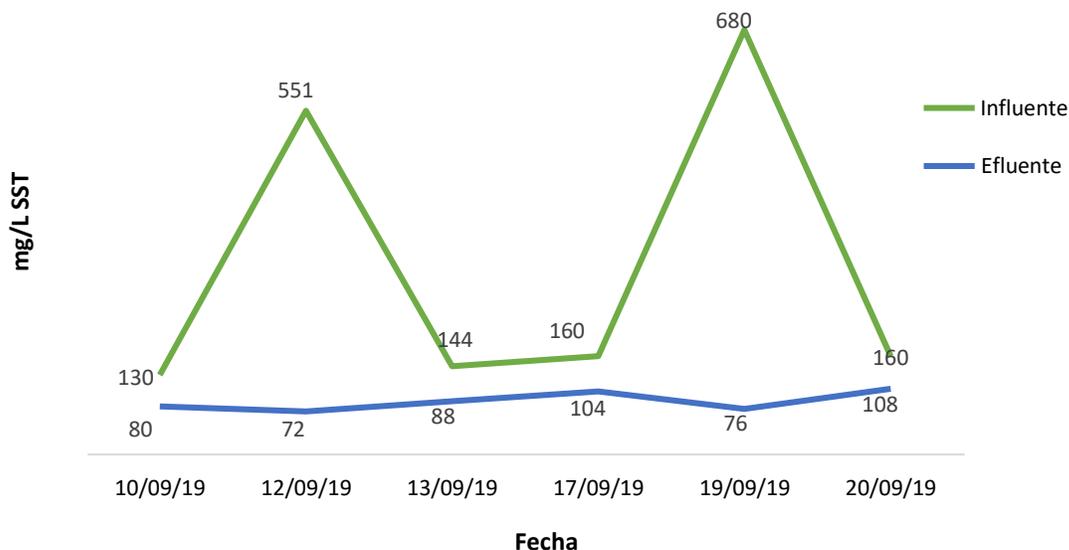


Fig. 18. Seguimiento de los SST.

4.2.3 Demanda química de oxígeno (DQO)

- **Curva de Calibración**

La curva de calibración (foto 2) se realizó analizando 5 estándares de referencia en un intervalo de 80 a 1000 mg/L. El coeficiente de correlación obtenido fue de 0.9863, el cual nos indica una buena asociación entre dichas concentraciones como lo indica el valor cercano a 1. En la fig. 19, foto 2, se ilustran los resultados.



Foto 2. Curva de calibración de DQO.

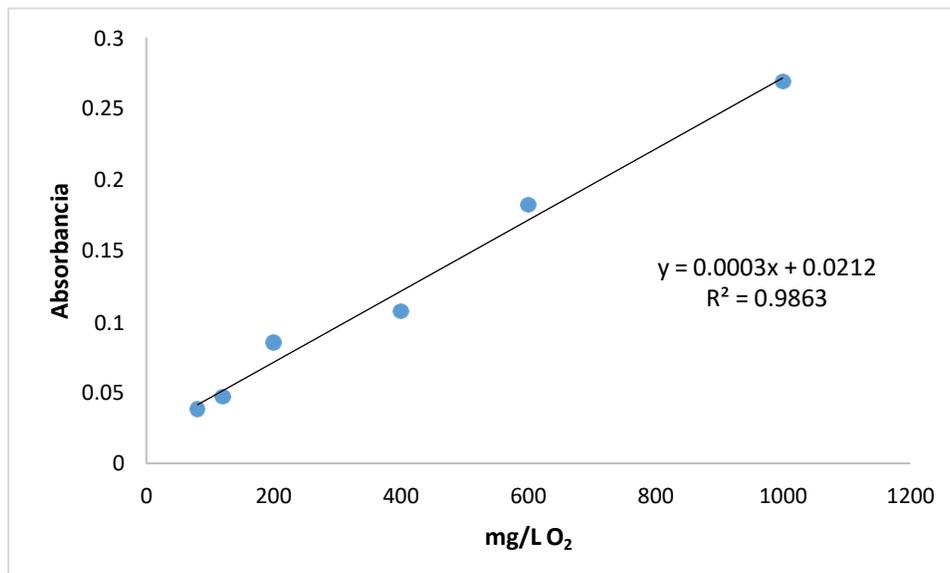


Fig. 19. Curva de calibración DQO.

- **DQO**

El parámetro de la DQO se emplea para medir la materia orgánica presente en agua residual. Los resultados de los análisis de DQO, se muestran en la tabla 3, fig. 20. Como se puede observar el valor promedio en el efluente se encontró dentro de los LMP (180 mg/L) que marca el proyecto de la NOM-001, en la gráfica se pueden observar un valor que esta fuera del LMP, lo cual pudo deberse a mayor aforo de personas en el centro educativo. Adicional con los resultados obtenidos de la DQO se calculó la eficiencia de remoción de la materia orgánica en la PTAR, donde el valor promedio fue de 77%, este valor se encuentra un poco abajo de los rendimientos típicos para un tratamiento biológico con lodos activados, que van del orden del 80-85% para DQO (Metcalf L. y Eddy H. , 1996).

Tabla 3. Resultados de los análisis de DQO.

Fecha (septiembre)	Tipo de muestra	mg/L		Eficiencia de remoción (%)
		influyente	efluente	
10	compuesta	469.33	186.00	60.37
12	Simple (9:00 h)	1109.33	29.33	97.35
13	Simple (13:00h)	652.66	62.66	90.40
17	compuesta	549.33	122.66	77.67
19	Simple (13:00 h)	982.66	362.66	63.10
20	compuesta	526.00	139.33	73.51
	Promedio	714.88	150.44	77.07

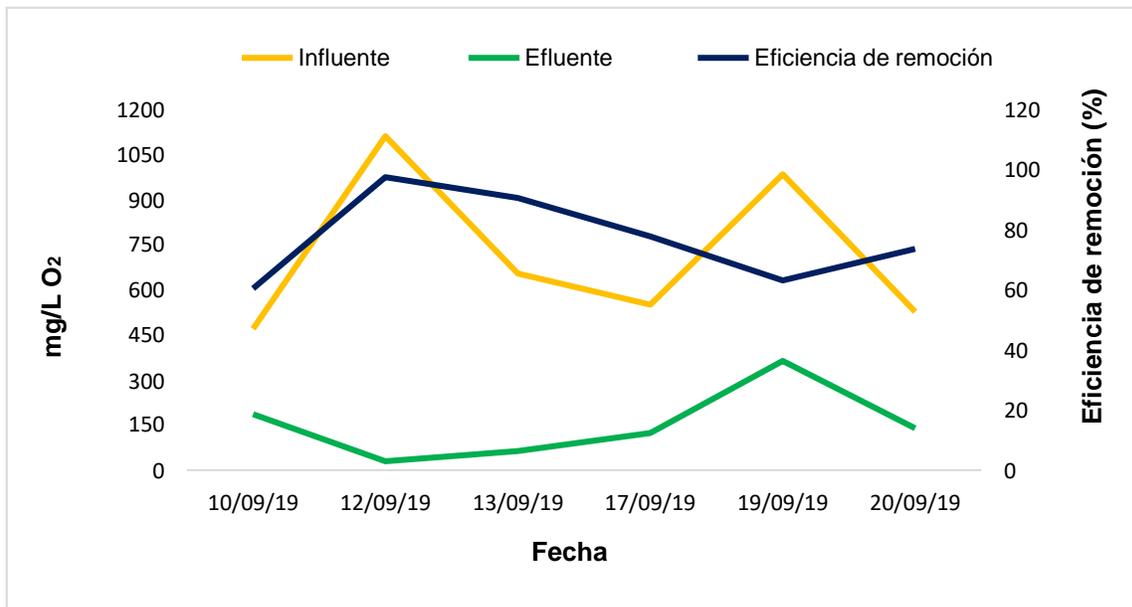


Fig. 20. Seguimiento y eficiencia de remoción de la DQO.

4.2.5 Fósforo total

- **Curva de Calibración**

Para estimar la concentración de fósforo total presente en el agua primero se realizó una curva de calibración (foto 3), la cual se presenta en la fig. 21.



Foto 3. Curva de calibración del fósforo.

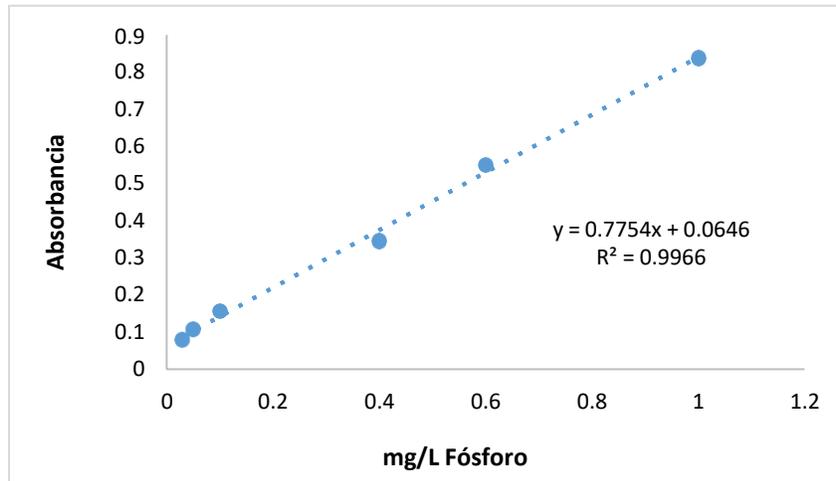


Fig. 21. Curva de calibración de fósforo.

- Determinación de fósforo total

En el análisis fisicoquímico del agua, el fósforo es un elemento presente en la misma y debe estar monitoreado para verificar que su concentración no sea elevada y pueda repercutir en el ambiente al ser desechada después de su tratamiento. Para el análisis de fósforo se realizaron tres muestreos compuestos, como se muestra en la tabla 4, fig. 22, el valor promedio del fósforo total tanto en el influente como en el efluente se encontró dentro del LMP establecido por la NOM-001, cuyo valor es de 30 mg/L. Nótese que a pesar de que el valor promedio se encontraba dentro del LMP, no hubo remoción fósforo durante el proceso.

Con respecto al fósforo, las mediciones en las cual apenas sobre pasa los niveles establecidos son los efluentes, ya que se observa que en los influentes el nivel es bajo y los efluentes aumentan, por lo tanto, podríamos deducir que durante el tratamiento (posiblemente secundario) el contacto con la materia orgánica y la biomasa, además de las bacterias presentes en el ambiente, produzcan ese aumento de fósforo.

Tabla 4. Resultados de fósforo total.

Fecha (feb. 2020)	mg/L fósforo total	
	influyente	efluente
11	3.87	6.05
12	4.10	5.64
13	4.44	5.91
Promedio	4.14	5.87

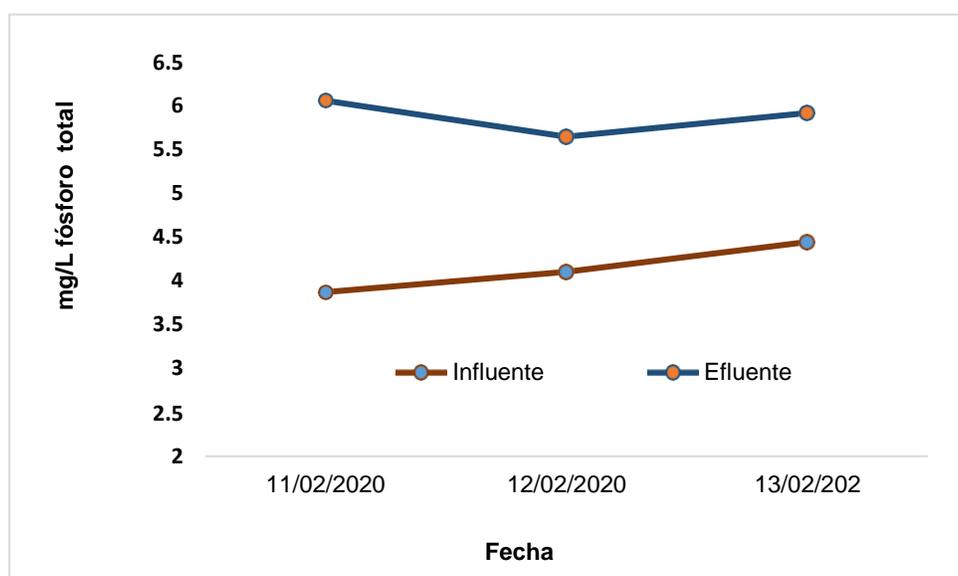


Fig. 22 Resultados de fósforo total.

4.3 Determinación de la capacidad de remoción de la DQO con la cepa aislada

Para determinar la capacidad de remoción de la materia orgánica medida como DQO, primero fue necesario enriquecer la cepa aislada en M.M durante 48 h a tres concentraciones diferentes: 25, 50 y 75 %. Una vez enriquecida la cepa se adiciono el porcentaje A.R necesario para completar el 100 %, quedando las siguientes relaciones:

25 % de MM: 75% A.R

50 % de MM: 50 %A. R

75 % de MM: 25 % A.R

Una vez realizadas las, mezclas se colocaron en el sheiker por 48 h, tomando muestras cada 24 h para realizar el análisis de DQO. Los resultados de la remoción de la materia orgánica medida como DQO se presentan en la tabla 5, fig. 23 y 24. Como se puede observar la cepa aislada (*Bacillus coagulans*) es capaz de ejercer una influencia sobre la remoción de la materia orgánica. Los porcentajes de remoción promedio de dos pruebas, fueron muy similares a las tres diferentes relaciones M.M- A.R, obteniéndose un promedio de remoción del 52 %, lo que se puede atribuir al hecho, de que, cepas adaptadas a las condiciones de las aguas residuales permiten una tasa de reducción más alta que las obtenidas por una cepa no adaptada, revelando la importancia de trabajar con una cepa bacteriana adaptada, lo anterior nos indica que es necesario llevar a cabo un proceso de adaptación más largo de la cepa aislada en el agua residual, con el fin de mejorar la eficiencias de remoción. No obstante, estos resultados son un hallazgo importante, ya que, la literatura con respecto a la utilización de la cepa aislada para la remoción de la materia orgánica es escasa, y sin embargo, C. Balboa y L. Vergara, 2021, reportaron el potencial de la aplicación de bacterias ácido lácticas en sistemas de tratamiento de agua, principalmente en la remoción de metales pesados como: Pb, Cd, Cr, etc. Con lo anterior podemos sugerir que uso de la cepa aislada *Bacillus coagulans* puede ser una alternativa que ayude a mejorar la degradación de materia orgánica presentes en aguas residuales.

Tabla 5. Resultados de la remoción de la materia orgánica medida como DQO

Relación	% Remoción promedio
25 % de MM: 75% AR	49.81
50 % de MM: 50 % AR	50.47
75 % de MM: 25 % AR	56.20

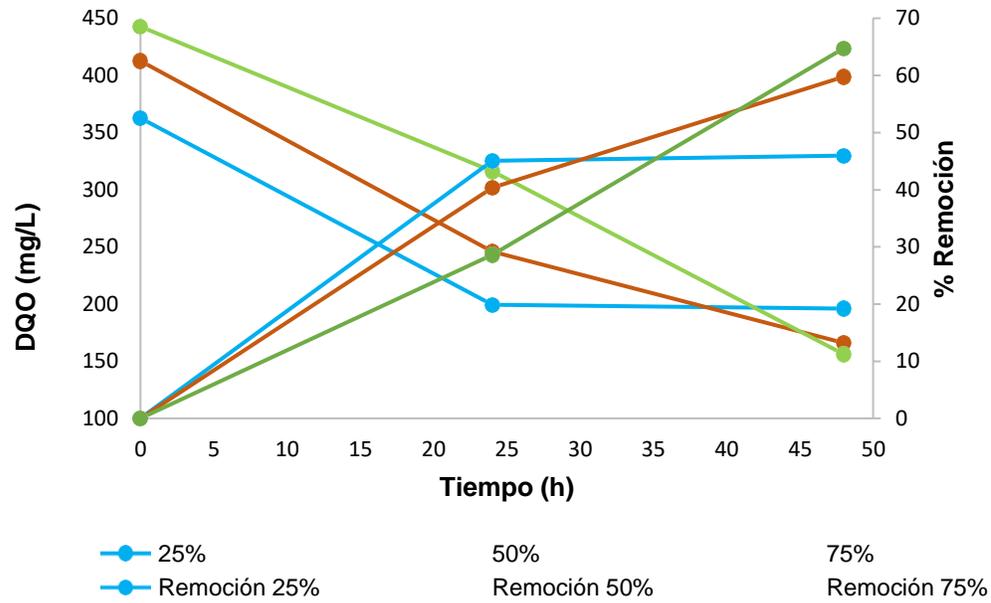


Fig.23. Eficiencias de remoción y concentraciones de DQO a las diferentes relaciones MM:AR. Replica 1

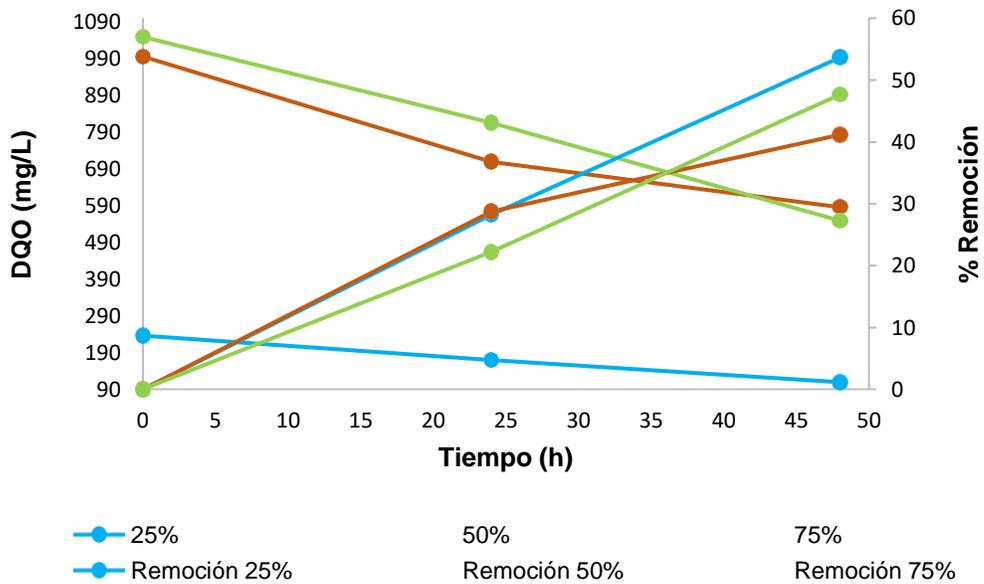


Fig.24. Eficiencias de remoción y concentraciones de DQO a las diferentes relaciones MM:AR. Replica 2

CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES

En el presente trabajo fue factible aislar y caracterizar una cepa bacteriana a partir de un cultivo puro. La bacteria aislada y caracterizada se identificó como “*bacillus coagulans*”.

Se determinó la capacidad de remoción de la DQO con la cepa aislada, obteniéndose un promedio de remoción del 52 % a tres diferentes relaciones M.M: A.R. (25, 50 y 75%), con lo que se puede sugerir que la bacteria *bacillus coagulans* puede ser una alternativa que ayude a mejorar la remoción de materia orgánica presentes en aguas residuales

Se determinó que la PTAR del centro educativo cumple con los límites máximos permisibles especificados en la NOM- 001-SEMARNAT-1996, en los parámetros de fósforo, DQO, SST y Temperatura.

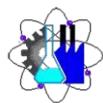
PERSPECTIVAS

Como se planteó en el objetivo general en el presente trabajo se pretendía encontrar las condiciones necesarias para lograr un buen desempeño de la bacteria aislada, con la finalidad de lograr degradar arriba de un 80% de materia orgánica, desafortunadamente, cuando se iniciaba esta fase fue necesario suspender el trabajo debido a la pandemia. Por lo anterior a continuación presento algunas sugerencias para futuros trabajos:

1. Buscar realizar algunas pruebas que ayuden a la caracterización más a fondo la bacteria aislada.
2. Realizar las curvas de crecimiento
3. Realizar las pruebas de aclimatación y eficiencias de remoción en un reactor empleando lodos de la PTAR en estudio y monitorear la biomasa en el reactor.
4. Una vez estabilizado el reactor realizar las cinéticas de degradación evaluando la remoción de la materia orgánica y el crecimiento bacteriano aislado.

REFERENCIAS

- C. Balboa y L. Vergara. (2021). Potencial aplicación de bacterias ácido lácticas en sistemas de tratamiento de aguas. *Ecosistemas*.
- CONAGUA. (2016). *Estadísticas del agua en México*. México .
- Damir Brdjanovic, e. a. (2008). *Tratamiento biológico de aguas residuales principio, modelación y diseño*. Londres: iwa publishing.
- Ewing, E. a. (1986). *Identification of enterobacteriaceae*. New York: Elsevier science publishing Co.
- Ewings, E. &. (1972). *Enterobacteriaceae*. Washington: USPHS.
- Gerard J. tortora, B. R. (2007). *Introducción a la microbiología*. Panamericana .
- Jaramillo, A. O. (2013). *Bioingeniería de aguas residuales, teoría y diseño*. Medellín, Colombia: ACODAL.
- M., K. A. (2015). *The role of lipids in activated sludge floc formation*. AIMS Environmental science.
- M., Kretzschmar A. y Manefield. (2015). *The role of lipids in activated sludge floc formation*. AIMS Environmental science.
- MacFaddin, J. F. (s.f.). *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. panamericana.
- Metcalf L. y Eddy H. . (1996). *Ingeniería de aguas residuales. Tratamiento, vertido y reutilización*. Mexico D.F.: McGraw-Hill.
- Renneberg, R. (2008). *Biotecnología para principiantes*. Reverté, S.A. .
- Rustigian and Stuart. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 47:109, 1. S. (s.f.).
- SCFI. (2001). *Norma mexicana NMX-AA-029- Determinación de fósforo total en aguas naturales, residuales y residuales tratadas*.
- SCFI. (2001). *Norma mexicana NMX-AA-030-Determinación de la demanda química de oxígeno en aguas naturales, residuales y residuales tratadas*.
- SCFI. (2015). *Norma mexicana nmx-AA-034- Medición de sólidos y sales disueltas en aguas naturales, residuales y residuales tratadas*.
- SCFI. (2016). *Norma mexicana NMX-008- Medición del pH en aguas naturales, residuales y residuales tratadas*.
- SEMARNAT. (2021). *Norma oficial mexicana NOM-001-SEMARNAT-2021, Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en cuerpos receptores propiedad de la nación*.
- Winkler, M. (1999). *Tratamiento biológico de aguas de desecho*. Mexico: limusa.



Cuernavaca, Mor., a 05 de diciembre de 2022

DRA. GENOVEVA BUSTOS RIVERA BAHENA
DRA. MARÍA DE JESÚS CRUZ CARRILLO
DRA. CAROLINA BUSTOS RIVERA BAHENA
DRA. CATALINA BUSTOS RIVERA BAHENA
ING. MARLENE ACOSTA SILVA
P R E S E N T E

Me permito comunicarles que han sido designadas integrantes del **COMITÉ REVISOR** del trabajo de: **TESIS**

Titulado:

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DE UNA CEPA BACTERIANA PARA SU APLICACIÓN EN EL TRATAMIENTO DE AGUA RESIDUAL.

Que presenta el **C. RICARDO CARRERA MORALES**

Del programa educativo de: **QUÍMICO INDUSTRIAL**

Para obtener el grado académico de: **LICENCIATURA EN QUÍMICO INDUSTRIAL**

A T E N T A M E N T E
Por una humanidad culta

DRA. VIRIDIANA AYDEÉ LEÓN HERNÁNDEZ
DIRECTORA

Se anexa firma electrónica

D I C T A M E N

DRA. VIRIDIANA AYDEÉ LEÓN HERNÁNDEZ
DIRECTORA DE LA FCQeI
P R E S E N T E

En respuesta a su amable solicitud para emitir DICTÁMEN sobre el trabajo que se menciona, me permito informarle que nuestro voto es:

VOTO	NOMBRE	FIRMA
	DRA. GENOVEVA BUSTOS RIVERA BAHENA	
	DRA. MARÍA DE JESÚS CRUZ CARRILLO	
	DRA. CAROLINA BUSTOS RIVERA BAHENA	
	DRA. CATALINA BUSTOS RIVERA BAHENA	
	ING. MARLENE ACOSTA SILVA	

El voto del comité es aprobatorio, se anexan firmas electrónicas

VALH/dco



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

VIRIDIANA AYDEE LEON HERNANDEZ | Fecha:2022-12-07 16:22:18 | Firmante

L3vE9KnHPpIbHgTfHqWdRVkn7+Mf3JbZaWOSYU0Td9qPx3jIICDuXpTfVCHAYB3PzmUh11Zi8YA9i8XD7yvP0f4ZiY/0qiz1WJFvG5KsBBMIUZGeACYcrgok3IP8h30QIhhkf8CR
JZYGgCv1uyK3UGxI8oFEIV0Pc1FKM4k6AXLTUECLRyCV5v9GMWPJbjRcKTeNwtUklyQii6A7cr4EB6tJ7Y59KTRq+XxCyOJatBHmooYgDZ5CQIMcrQwzul8uhFh3u6pC7a0LJz
RRmGtteNvHZXi7u83U/IHCdTSv0z8WMZ1bh+FRsyb6a48bY5SdO91GXkgQJ7hunIjdXQUZA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[3IBwiQZNc](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/mKBruMv2aeTQcDKEjUiAkr4Cfydb4Xli>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

GENOVEVA BUSTOS RIVERA BAHENA | Fecha:2022-12-07 19:09:22 | Firmante

dx8GDuH/jh3/Wp7yc8n4NIUQnt6WDjZbP08I2KGIKavV1471nC3RACaomfyFKV0yLaikCJTSM/c91G2eAYePRmBiAesUSuDIZ2BFIDp3o0o9sk1GvEVFt4cS2ix0YyQCVICikR8k pEMJQOFQXcQkOwqKsHSvucRNo12F3F2WdyZxjlytDaBICfpepe+EIE1IVz/E/6mNDshuwx2wf71rc4FqMYogRV5hlpFFK52a8QO4RPVukv7c9w/DtBO6i8O/kAV2zP0cs96doM2J GJlrzyi1mXZRoZKzYr6qj6b7nMpcG/J74CNvRGgVamjacF86p2WvKcPc8yMI2TVUThBQ==

MARLENE ACOSTA SILVA | Fecha:2022-12-08 10:33:12 | Firmante

q6foEA+FABLRG59pYdwG+JJ6Bhz5sODV3YLxVzVdVxbWwu/Ppbx3JkM76gOzFRvcXtur/JcvPKTgODJ+nB8KKJfOXeSvmsIT6Wyh9MKG8JMIh85OCm/iMSehRfi3rksKh0n6ifhw5 +ud7Y06ibK9iG8K8VFM2zYiFHozYfcTBRxrAvWziyCP9VMCpWS87VOMNYuO7DZkwTd34HdDQT8IU7LwW+r99eCF/7ss2gLJXBNvmOZpYdwFNGomd6nqiyxnF3BlmuUdpyhbb1 e2d8yG8hInImrdtTSNAiJQpR4XaGoo+054Y+M88/5MwRsnGK7BWslg5RtdyqzIEgwcHHfhkg==

MARIA DE JESUS CRUZ CARRILLO | Fecha:2022-12-09 13:08:13 | Firmante

rTbrQPfjiFmIWmtuoOKWcga97wXftd0e8ZGikB7xW+HHbLcQdbjkrbzD9Lefw9GZ19xu6BmLdnSPUF8Ux065oUkFcXt+L0GI3+s17RXwu0skVAMyoo/SPFLRJ1NzA851ACfO6l bWKRNM/QjMtnkqJoY+vzKUpF8mCOIRKFBXfnvhefPt2C/CgfkQ5YWGXFQVY4OUkKuMd8WILST04x7kDQic75sfzbcq83Le39MMQUngUUFfIKsZ12NEhdSCmDNPeJAuGyEbmP aaS3iG5lcCPImgMXh5qYr+++1sDAH5fKP3/7aDQREgQtfdk0QAY06i0dTPu4sKjuLdydh18gXew==

CATALINA BUSTOSRIVERA BAHENA | Fecha:2023-01-16 07:17:26 | Firmante

LdZu/2DbkJP8rE8UTsbzAT9lvZwb78JwbAwJQOh5AWzO0fRM/w4U11bkbv+iHPdbV+xBR/T9KxjXfX4X5NjZ9wGVVqvl7w+fo8zpQXhbSii/i2u+/IMh6MTZawgF6bnNGW3Pvgu+u 1je0seQXKTZtmRbE/JuoWZYSZ9rDYEk7bm8BXME4nql+kQHx47hzhFi3east1dLhqlGrwZ496c5uXIQMMTa6W2OaETH79KHVPgvdvELH/w6XiNq4059486p+bHDNYS/4q/gMP/i 98UllrgSt5AxF3c2/aPP+Eb5jKdwY4VibGEHuS4+6NbQoXXH2+pCyytZf/8ZDbRMXK1g==

CAROLINA BUSTOS RIVERA BAHENA | Fecha:2023-01-20 11:08:32 | Firmante

QV5ZjKGe7mCrF94wBi19yEO9ywcFs5e2FnsJrlcWGa9LxKRVtBj++TzDVoEOdcZm92Bel2s4FCZJO85uL+1TH9u+uG833y0G2mW+D6IqNID+JJILq/G+ILiRK9CVeXNxFtTW4UT INf6crfYMOpYRNBNH3TgappVdOQnr9xYMrigZCRDkf13Sj2jEgfGkok9lhcGof7IVOxCdQLWnn0Evdsu5BKExYoSuAZx7MQUd56Skckw3SPEeoVAjnCAePb3lzmbLpK/tSL+Xii CzWbmbfTBLGZu+RGpbMNB5w/FOcNqDpDodeCbTibnyQvgYofz3Ela7IWAcjxr7aegrXg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



0kfpMj1s4

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/6kfbYrGL9r5mTauXeEeMjmQ80gFKXPj>

