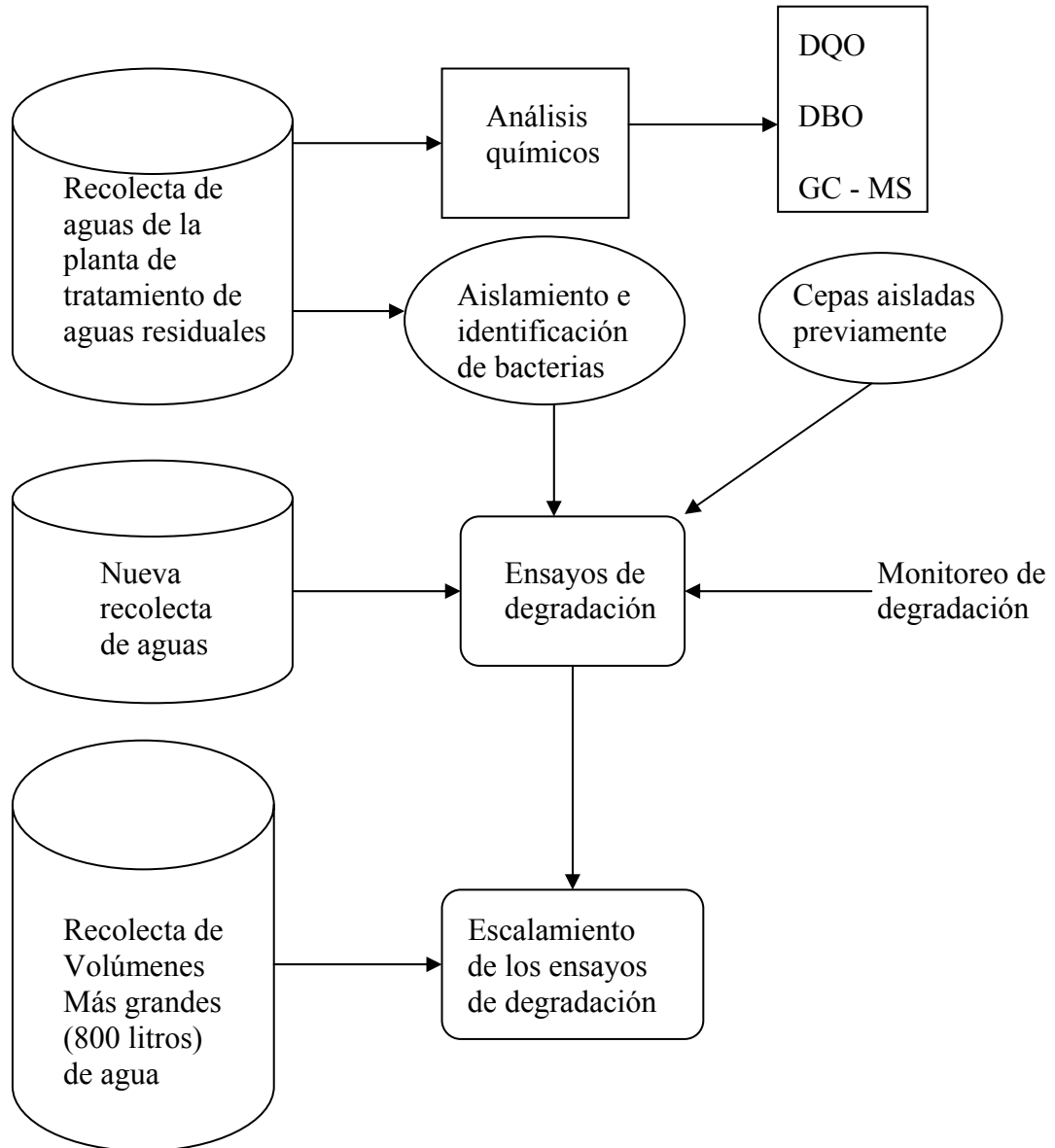


## 6 MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 ESQUEMA DE TRABAJO



## **6.2 RECOLECCIÓN DE AGUAS**

Se colectaron muestras de agua en diferentes fechas de al menos tres sitios de la planta de Kimberly Clark complejo Orizaba, dependiendo de los tratamientos que la empresa estuviera realizando.

A las aguas se les determinó DBO y DQO, posteriormente las aguas fueron esterilizadas y analizadas por Cromatografía de Gases / Espectrometría de Masas. La última muestra colectada no se esterilizó, debido a su volumen y al propósito de asemejar condiciones reales. Posteriormente se inocularon con diferentes bacterias y se aerearon durante todo el tiempo que duró el análisis. Durante las semanas de degradación se fueron tomando periódicamente muestras para la medición de los distintos compuestos, cuenta viable y análisis en cada tiempo.

## **6.3 DETERMINACIÓN DE DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO**

Se determinó utilizando el equipo BOD-Track (HACH), mostrado en la figura 1, basándose en el método de incubación por 5 días a temperatura ambiente, Se hizo la prueba para los límites superiores de 350mg/ml y de 700 mg/ml en caso de exceder el primer límite. Por tal motivo se utilizaron 160 y 95 ml de la muestra respectivamente. A la tapa del recipiente se le agrega hidróxido de litio, y en los bordes se le unta un material graso para evitar que se introduzca aire del exterior. A través de una mariposa magnética, el equipo mantiene la muestra en agitación durante los 5 días correspondientes, además de mantenerlas a 25°C, mediante una incubadora. La lectura se puede hacer en cualquier momento del experimento.



Figura 1. Equipo de BOD-Track (HACH).

#### **6.4 DETERMINACIÓN DE DEMANDA QUÍMICA DE OXÍGENO**

Los  $\square$  intervalos utilizados fueron de 500-10 000 mg/L COD $\square$ , menos en las aguas de salida del reactor, donde el  $\square$ o fue de 100-1500 mg/L COD. Son los métodos 14555 y 14541 respectivamente, de éste equipo. Estos intervalos determinan las soluciones para la digestión, así como los volúmenes necesarios. Como se describe a continuación:

500-10 000 mg/L COD: Utiliza 2.2 ml de la solución de digestión A (14679), compuesta por sulfato de mercurio y ácido sulfúrico; y 1.8 ml de la solución de digestión B (14680), compuesta por dicromato de potasio y ácido sulfúrico. Estas cantidades están dadas para 1 ml de muestra. Las soluciones de digestión son fabricadas por Merck (Alemania), especialmente para determinaciones de DQO.

100-1500 mg/L COD: Utiliza 0.3 ml de la solución de digestión A (14538) y 2.3 ml de la solución de digestión B (14539<sub>100-1500</sub>). Estas cantidades están dadas para 3 ml de muestra.

Ya que están preparadas las soluciones, se colocan los tubos de reacción en el digestor “Thermoreactor TR 300” de Merck (Darmstadt, Alemania), previamente calentado a 150°C y se deja en reflujo por dos horas. Al final de este tiempo se deja que los tubos se enfríen y que sedimente el precipitado, para poder medir la tinción en el espectrofotómetro SQ 118 de Merck (Darmstadt, Alemania), previamente calibrado y ajustado a una longitud de onda de 585 nm.

## **6.5 MICROEXTRACCIÓN, CROMATOGRAFÍA DE GASES Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS**

La técnica de microextracción en fase sólida utilizando una fibra con una película de poliacrilato, para el caso de compuestos orgánicos semivolátiles, resulta de gran utilidad en la valoración □. Esta técnica es muy eficiente, sencilla y económica. La fibra está contenida dentro de una pequeña aguja. Esta fibra es expuesta al analito con el objetivo de extraerlo, concentrarlo y purificarlo a partir de la matriz de la muestra □. El equilibrio de adsorción se obtiene □ entre 2 y 15 minutos de exposición de la fibra □ con la solución. En ésta investigación se trabajó con 12 minutos de adsorción, ya que dicho tiempo mostró los mejores resultados. Después del tiempo transcurrido, la fibra se inserta nuevamente en la aguja y es removida del vial que contiene la muestra, para posteriormente inyectarla inmediatamente en el cromatógrafo de gases. En el inyector de este instrumento los analitos adsorbidos en la fibra, son térmicamente desorbidos, para su posterior análisis. En este trabajo un tiempo de 3 minutos es el empleado. Las muestras que van a ser analizadas mediante esta técnica deben de tener un pH adecuado, así como estar saturadas con sal (NaCl). Por tal motivo se le agrega ácido clorhídrico a la muestra hasta que se alcanza un pH de 2. Posteriormente se saturan 3 ml de la muestra, con un gramo de sal. Esto permite que la sensibilidad aumente de notablemente.

Una vez que la muestra se ha introducido al “Gas Chromatograph STAR 3400 Cx” de Varian, se deja correr durante 24 minutos, para después obtener el análisis cuantitativo (si previamente se realiza una curva de calibración) y el análisis cualitativo con ayuda del espectro de masas “Mass Spectrometer SATURN 2000” de Varian, el cual se encuentra adaptado al cromatógrafo de gases. Antes de poder correr las muestras, la columna debe de estar ajustada a una temperatura inicial de 40°C y el inyector a una temperatura de 260°C.

El helio es utilizado como gas de arrastre, a través de la columna DB5, la cual está empacada con el polímero fenilpolidimetilxiloxano al 5 %. Se mantiene una presión de 12 psi lo que conduce a un flujo de 1 mililitro por minuto. La fragmentación de los compuestos en el espectro de masas es lo que da la huella digital de los mismos.

El tiempo de retención nos indica la afinidad del compuesto al material de empaque de la columna. La integral del área bajo la curva nos muestra la cantidad relativa de compuesto que sale de la columna. El espectro de masas nos ayuda con el análisis cualitativo, pero además se tiene una base de datos que nos permite comparar los espectros, para cerciorarnos de que compuesto se trata.

## **6.6 DETERMINACIÓN DE PENTACLOROFENOL POR UV**

Para comprobar la capacidad degradadora de los consorcios bacterianos sobre el pentaclorofenol (PCF), se utilizó el equipo de ultravioleta (UV) “Cary 100 Con UV-Visible Spectrophotometer” de Varian.

Las muestras se colocan en celdas de cuarzo, ya que éstas no absorben radiación UV. Se colocó como blanco el medio mínimo (en forma líquida), sin el PCF y como inicial se utilizó dicho medio con PCF en una concentración de 50 ppm. De esta solución se realizaron varias diluciones para hacer la curva de calibración.

## 6.7 CUENTA VIABLE EN PLACA

Las cuentas viables se realizaron en agar nutritivo y 2XYT, ya que éstos medios de cultivo son ricos en nutrientes. Se sembraron una serie de diluciones, para así poder obtener el número total de UFC. Las cuentas viables se realizaron por triplicado para evitar lecturas erróneas. Se colocaron 10 µl por dilución y posteriormente se calculó por el factor de dilución.

## 6.8 MATERIAL BIOLÓGICO

### 6.8.1 CEPAS UTILIZADAS

Los ensayos de degradación se realizaron con consorcios bacterianos compuestos por mezclas de distintas cepas, aisladas previamente en los laboratorios de la UDLA-P, así como cepas autóctonas de las aguas residuales de Kimberly Clark, como muestra la tabla 1.

Tabla 1. Lista de cepas utilizadas en este trabajo.

Cepas previamente aisladas:	Fenotipo
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Degradadora de dibutilftalato (DBP)
<i>Klebsiella pneumoniae pneumoniae</i>	Degradadora de DBP
<i>Klebsiella pneumoniae pneumoniae</i>	Degradadora de dietilftalato (DEP)
<i>Escherichia coli</i>	Degradadora de DEP
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	Degradadora de p-nitrofenol (PNP)
Simbiosis de <i>Serratia marcescens</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> y <i>Stenatrophomona maltophiila 2</i>	Degradadoras de ácido cloranílico (ACA)
Cepas autóctonas	
<i>Bacillus subtilis</i>	
<i>Enterobacter cloacae</i>	
<i>Enterobacter sakazakii</i>	
<i>Plesio. shigelloides</i>	

La columna de la izquierda enlista las cepas aisladas, tanto en trabajos de tesis anteriores, como las bacterias autóctonas aisladas en este trabajo. La columna de la derecha enlista el fenotipo de las bacterias.

## 6.9 SIEMBRA DE LAS AGUAS

Se intentó que la siembra se realizara con cepas que se encontraran en la fase de crecimiento *log*. Se ajustaron en solución salina al 0.85%, a una densidad de 0.5 de McFarland. (ver Apéndice), que equivale a 1 500 millones de Unidades formadoras de colonia (UFC)/ml. Para esparcir las bacterias de manera homogénea en la solución salina se utilizó el “Vortex genie 2” de Fisher Scientifics. Ya teniendo la cepas a la densidad deseada se colocó 1 ml de cada una, que conformaría el consorcio, en la muestra de agua a ser tratada.

## 6.10 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE CEPAS

De las aguas recolectadas en la planta de tratamiento de Kimberly Clark, se tomaron 100  $\mu$ l para sembrar en placas con agar nutritivo. A partir de ahí se realizaron resiembras posteriores para intentar obtener colonias puras. Al obtener cepas aisladas, éstas se sembraron en medio mínimo basal (ver Apéndice acerca de preparación de medios), con las aguas residuales previamente esterilizadas como única fuente de carbono, para constatar que si se trataba de las bacterias deseadas y no contaminación durante el proceso.



Figura 2. MiniApi para la identificación de bacterias.

Para la identificación de las cepas previamente aisladas se les realizó una tinción de Gram, cuyos resultados se observaron en el microscopio óptico Labophot 2-A (Nikón, Japón).

La tinción de Gram y la morfología bacteriana, permitieron la elección de las galeras adecuadas para su posterior identificación bioquímica en el miniAPI (Figura 2.) de bioMérieux (Francia), el cual funciona a base de pruebas bioquímicas y se miden de forma colorimétrica.

### **6.11 ALMACENAMIENTO**

Las cepas fueron congeladas, para su almacenamiento, de la siguiente manera. Se colocó en un vial 1.5 ml de caldo 2XYT conteniendo a la bacteria después de 24 horas de crecimiento y 200  $\mu$ l de glicerol al 20 % estéril.