



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

---

---

**MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES – ICUAP  
ÁREA DE MEDIO AMBIENTE Y SALUD.**

**PREDEFENSA DE TESIS:**

**“Evaluación microbiológica y fisicoquímica del agua residual y tratada proveniente de una industria pastelera como parte de su programa de responsabilidad social”.**

**PRESENTA:**

**LUVIA YALI JIMÉNEZ TREJO.**

**DIRECTORA DE TESIS:**

**DRA. ELSA IRACENA CASTAÑEDA ROLDÁN**

**CO-DIRECTORA DE TESIS:**

**DRA. FABIOLA AVELINO FLORES**

**Mayo 2022**



## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	5
2. MARCO TEÓRICO.....	6
2.1. AGUAS RESIDUALES E INDUSTRIA ALIMENTICIA.....	6
2.2. PARÁMETROS DE CALIDAD DEL AGUA RESIDUAL .....	8
2.3. PLANTA DE TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES .....	11
2.4. LA CLASIFICACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS (DESCRIPCIÓN DE CADA TRATAMIENTO).....	12
3. MARCO REFERENCIAL.....	¡Error! Marcador no definido.
3.1. MICROBIOMAS DE LAS AGUAS RESIDUALES, SU IMPACTO .....	15
4. PREGUNTA CIENTÍFICA: .....	17
5. OBJETIVOS .....	17
5.1. OBJETIVO GENERAL .....	17
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	17
6. HIPÓTESIS.....	17
7. METODOLOGÍA Y TIPO DE INVESTIGACIÓN.....	17
7.1. EMPRESA PASTELERA COMO ZONA DE ESTUDIO.....	18
7.2. LA INDUSTRIA PASTELERA POBLANA .....	19
7.3. METODOLOGÍA.....	22
7.4. MUESTREO DEL AGUA RESIDUAL DE LA PTAR EN ESTUDIO.....	23
7.5. ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS .....	25
7.6. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD DE LA DESCARGA DE AGUAS RESIDUALES.....	25
7.6.1. COLIFORMES TOTALES, FECALES y <i>E. coli</i> POR LA TÉCNICA DEL NMP.	26
7.6.2. PRUEBA CONFIRMATORIA PARA COLIFORMES TOTALES.....	27
7.6.3. PRUEBA CONFIRMATORIA PARA COLIFORMES FECALES: .....	27
7.6.4. PRUEBA CONFIRMATORIA PARA <i>E. coli</i> .....	27
7.7. PRUEBAS MOLECULARES PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES PATÓGENAS: REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	28
7.7.2. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA.....	29
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	33
9. CONCLUSIONES PRELIMINARES .....	52
10. BIBLIOGRAFÍA .....	53

## ÍNDICE DE TABLAS

Número de tabla	Título	Página
Tabla 1	Plantas Municipales de Tratamiento de aguas residuales en operación en el Estado de Puebla. Dic, 2015. Tomado de: SEMARNAT y CONAGUA 2015	5
Tabla 2	Número de muestras para el análisis de agua residual de acuerdo a las horas de tratamiento.	10
Tabla 3	Límites máximos permisibles de contaminantes. Tomado de: NOM-003-SEMARNAT-1997	11
Tabla 4	Secuencia de los iniciadores genes blanco y tamaño de los amplicones para los diferentes microorganismos detectados en este estudio.	26
Tabla 5	Resultados de análisis fisicoquímicos del 04 de Abril 2019	29
Tabla 6	Resultados de análisis fisicoquímicos del 03 de Julio 2019	30
Tabla 7	Resultados de análisis fisicoquímicos del 03 de Octubre 2019	31
Tabla 8	Número Más Probable x 100 mL de Coliformes totales, coliformes fecales y <i>Escherichia coli</i> en muestras de agua residual tratada de empresa Pastelera.	32
Tabla 9	NMP X 100mL de Coliformes totales, coliformes fecales y <i>Escherichia coli</i> , pH y temperatura con sus repeticiones en los 4 puntos de muestreo de la PTAR de la industria pastelera de la ciudad de Puebla.	33
Tabla 10	Análisis de las 4 bacterias patógenas en el agua residual a través de la PCR.	39

## ÍNDICE DE FIGURAS

Número de figuras	Título	Página
Figura 1	Ubicación de la zona de estudio. Empresa pastelera del municipio de Puebla (N°114) del Estado de Puebla	14
Figura 2	Plantas tratadoras municipales de Puebla	15
Figura 3	Diagrama del proceso de producción de la empresa pastelera y descarga de aguas residuales a la planta de tratamiento	17
Figura 4	Diagrama de flujo de la metodología que se siguió para el análisis de las aguas residuales provenientes de la PTAR de la Empresa pastelera en estudio.	19
Figura 5	Puntos de muestreo del agua residual en la planta de tratamiento de aguas de la empresa pastelera.	20
Figura 6	Diagrama de flujo de la metodología de NMP para análisis de agua. Fuente: NMX-AA-042-SCFI-2015.	24
Figura 7	Diagrama de flujo de técnica de extracción de DNA	25
Figura 8	Muestras de DNA total extraído de cepas de referencia	34
Figura 9	Se muestra el amplicón de 284 pb para el gen inv A de <i>S. typhimurium</i>	35

Figura 10	PCR punto final. No hubo amplificación del gen hly A de 237 pb de <i>Listeria monocytogenes</i>	36
Figura 11	PCR punto final. No hubo amplificación del gen bp26 de <i>Brucella melitensis</i>	37
Figura 12	PCR punto final. No hubo amplificación del gen gtrI de <i>Shigella flexneri</i>	38

## 1. INTRODUCCIÓN

La Organización de las Naciones Unidas OMS en 2015, a través de la Agenda 2030 de Desarrollo Sostenible, ha tomado atención en el objetivo de “garantizar la disponibilidad de agua y su gestión sostenible y el saneamiento para todos”. Problemática ambiental en donde se tiene el concepto erróneo de que el agua es un bien económico sin límite, lo que compromete la sostenibilidad de este recurso. El agua es un recurso natural muy valioso que por la actividad antropogénica e industrial genera aguas residuales, las que se han intentado reutilizar por medio de diversos tratamientos. Dentro de los contaminantes que predominan en el agua son los de origen microbiológico que van en combinación con sustancias químicas derivadas de los desechos de alimentos, residuos industriales y domésticos. En general, las aguas residuales son un 99.9% de agua y el 0.1% es material sólido que está conformado por minerales y, materia orgánica (Avila Peltroche, 2015). La materia orgánica proviene principalmente de residuos humanos y de animales, compuestos por micro elementos como carbohidratos, proteínas y grasas que proporcionan la mayor parte de los nutrientes requeridos para que los microorganismos en ese ecosistema crezcan y se reproduzcan. Las industrias de alimentos son las que se han reportado que eliminan mayor cantidad de compuestos orgánicos en forma de sólidos suspendidos totales.

En este trabajo se investigó la calidad microbiológica del agua residual y tratada de una empresa pastelera que cuenta con una planta de tratamiento de agua propia, se buscaron los indicadores de calidad microbiológica (Coliformes totales CT: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia* y *Klebsiella*), además coliformes fecales (CF, que incluye *Escherichia coli*) y cuatro géneros bacterianos patógenos (*Salmonella sp*, *Shigella sp*, *Brucella sp* y *Listeria sp*) para descartar que el agua que sale de la empresa fuera una fuente de riesgo y contaminación y respaldar la responsabilidad social de la empresa. Por otro lado, se realizó un análisis de la eficiencia del tratamiento primario fisicoquímico del agua residual de la PTAR mediante un análisis comparativo de tres reportes realizado por una empresa particular contratada por la industria pastelera.

## **2. MARCO TEÓRICO.**

### **2.1. AGUAS RESIDUALES E INDUSTRIA ALIMENTICIA.**

Las aguas residuales son aquellas aguas de composición diversa que provienen de las diversas actividades antropogénicas como las industriales, municipales, comerciales, de los diferentes servicios hasta los domésticos. (Rivas 2011).

La composición de las aguas residuales de la industria alimenticia es principalmente materia orgánica en suspensión, coloides, o en solución; y dependiendo de la forma que se encuentra se utilizan diferentes técnicas para separarlas, para la materia en suspensión sólo es necesario aplicar medios mecánicos, para la materia coloidal se requiere un tratamiento fisicoquímico preliminar y para la materia en solución puede precipitarse y posteriormente separarse por medios mecánicos, esto es a grandes rasgos lo que se conoce como tratamiento de agua (Rojas 2002).

Por la demanda de alimentos y diversificación de ellos, la industria ha crecido y aumentado la descarga de aguas residuales hacia los efluentes municipales. Los vertidos residuales de los procesos de elaboración de productos alimenticios normalmente contienen materia orgánica en concentración variable y se hace énfasis en esta debido a que constituye uno de los indicadores de mayor importancia para el desarrollo de la microbiota en las aguas residuales y en los lodos que resultan post-tratamiento y que son materiales altamente contaminantes.

En Puebla la industria pastelera ha crecido de manera importante en el área de alimentos procesados. Del agua que esta industria utiliza, el 50% se elimina después de la limpieza de materiales y equipos como agua residual, así como el agua residual que resulta de los servicios de sanitarios dentro de la empresa.

Las aguas residuales de una industria pastelera tienen características muy diferentes tanto en sus valores de pH (4 - 7) como en la DQO, así como una elevada DBO, por ello la dificultad en el tratamiento biológico (Chen, 2006)

Puebla cuenta con seis plantas de tratamiento de aguas residuales municipales, en las que se realiza el tratamiento primario avanzado, es decir, el que lleva incluido una dosificación de reactivos para la formación de flóculos y aumentar la sedimentación Tabla 1. Se ha reportado que algunas de las plantas son obsoletas

y que el río Atoyac está contaminado, aunado a ello las industrias que no cuentan con planta de tratamiento de agua residual, realizan sus descargas en barrancas o arroyos directamente (SEMARNAT y CONAGUA, 2015).

**Tabla 1. Plantas Municipales de Tratamiento de aguas residuales en operación en la ciudad de Puebla. Dic, 2015. Tomado de: SEMARNAT y CONAGUA, 2015.**

Municipio	Localidad	Nombre de la planta	Proceso	Capacidad instalada (l/s)	Caudal tratado (l/s)	Cuerpo receptor o reúso
<b>Puebla</b>	Heroica Puebla de Zaragoza	Atoyac Sur	Primario avanzado	400.0	436.0	Río Atoyac
<b>Puebla</b>	Heroica Puebla de Zaragoza	Parque Ecológico	Discos biológicos o Biodiscos	80.0	80.0	Río Alseseca/ riego de áreas verdes
<b>Puebla</b>	Heroica Puebla de Zaragoza	Puebla Alseseca	Primario avanzado	700.0	758.0	Río Alseseca
<b>Puebla</b>	Heroica Puebla de Zaragoza	Puebla Barranca del Conde	Primario avanzado	340.0	209.0	Río Atoyac
<b>Puebla</b>	Heroica Puebla de Zaragoza	Puebla San Francisco	Primario avanzado	1 100.0	1 292.0	Río Atoyac
<b>Puebla</b>	Heroica Puebla de Zaragoza	Alseseca Sur/Galaxia la Careta	Biológico	35	---	Río Las Lajas

## **2.2. LA RESPONSABILIDAD SOCIAL Y LAS AGUAS RESIDUALES EMPRESARIALES.**

El abordaje de problemas ambientales como es el tratamiento de aguas residuales por parte de la industria para que sea amigable con el medio ambiente en el contexto de responsabilidad social, surge hace pocos años y es complejo, sin embargo, Gracia, 2007 hace referencia que para cambiar un problema complejo hace falta modificar el pensamiento y situarse en esta realidad.

Actualmente es necesario que las organizaciones y compañías, se den cuenta de que en caso de no ser responsables de la gestión de su actividad empresarial pueden impactar negativamente el medio, en sus dimensiones social, natural y económica;(García, 2007).

El concepto de “la responsabilidad social empresarial”, inicia desde la década de los años cincuenta, pero es hasta los noventas que ya es considerada por los diversos estratos empresariales y ámbitos organizacionales. (García 2007).

“La responsabilidad social empresarial es un concepto que implica la necesidad y obligación de las empresas e instituciones que desarrollan algún tipo de actividad económica, de mantener una conducta respetuosa de la legalidad, la ética, la moral y el medio ambiente. Es el compromiso de la empresa en la contribución al desarrollo sostenible; lo cual implica la adopción de una nueva ética en su actuación en relación a la naturaleza y la sociedad, un motivo de solidaridad, el sentido de responsabilidad por salvar las condiciones que sustentan la vida en el planeta, el tributo la calidad de vida de los grupos de interés, sus familias y la comunidad” (García, 2007).

“El 25 de septiembre del 2015, los 17 Objetivos de Desarrollo Sostenible de la Agenda 2030 para el desarrollo sostenible fueron adoptados por los líderes de 193 países, en una histórica cumbre de Naciones Unidas. Ahora, dos años desde su aprobación, el sector privado está intensificando sus esfuerzos para cumplir los Objetivos Globales para las personas, el planeta y la prosperidad”

De los Principios del Pacto Mundial derivan de declaraciones de Naciones Unidas en materia de derechos humanos, trabajo, medioambiente y anticorrupción y gozan de consenso universal.

### **Diez Principios del Pacto Global**

- **Derechos Humanos.**

- 1- Las empresas deben apoyar y respetar la protección de los derechos humanos proclamados internacionalmente.
- 2- Asegurarse de no convertirse en cómplices de abusos de los derechos humanos.

- **Estándares Laborales.**

- 3- Las empresas deben permitir la libertad y el reconocimiento efectivo del derecho a la negociación colectiva.
- 4- La eliminación de todas las formas de trabajo forzado y obligatorio.
- 5- La eliminación del trabajo infantil.
- 6- La eliminación de la discriminación en lo relacionado al empleo y la ocupación.

- **Medio Ambiente**

- 7- Las empresas deben apoyar el abordaje precautorio de los retos ambientalistas.
- 8- Llevar a cabo iniciativas para promover mayor responsabilidad ambiental.
- 9- Promover el desarrollo y difusión de tecnologías amigables al medio ambiente.

### **Lucha contra la corrupción**

- 10- Las empresas deben trabajar contra la corrupción en todas sus formas, incluidas extorsión y soborno.

Las ventajas de la responsabilidad social para la empresa son que colabora con la sociedad, además de que protege y conserva los recursos naturales. La responsabilidad social empresarial es benéfica para la empresa desde el punto de vista económico y resulta un programa que puede brindarle utilidades desde el mediano a largo plazo.

## EMPRESA SOCIALMENTE RESPONSABLE Y DISTINTIVO ESR.

El Distintivo ESR ® es un reconocimiento otorgado anualmente en México por el Centro Mexicano para la Filantropía (Cemefi) y AliaRSE. Cemefi es promotor y miembro fundador de Forum Empresa, una alianza hemisférica de organizaciones nacionales que comparten la visión de promover la Responsabilidad Social Empresarial en América. Forum Empresa es la red de responsabilidad social más grande del mundo (Cajiga, 2005).

Dicho distintivo no sólo agrega valor a la marca y rentabilidad, sino que acredita a las empresas ante sus empleados, inversionistas, clientes, autoridades y sociedad en general, como una organización comprometida voluntaria y públicamente con una gestión socialmente responsable como parte de su cultura y estrategia de negocio.

El Distintivo ESR® no es un compromiso de una sola vez, sino que debe refrendarse año con año para mantener vigente la cultura de la responsabilidad social.

La responsabilidad social de la empresa es una decisión voluntaria, a pesar de que existe una normatividad en este campo, es una combinación de aspectos legales, éticos, morales y ambientales. En épocas anteriores la política era máximo de ganancias con el mínimo de inversión y sin importar los costos sociales y medioambientales. La responsabilidad social de la empresa abarca aspectos internos, dirigidos a los colaboradores o el equipo de trabajo, sus asociados y accionistas, y los externos, dirigidos a clientes, proveedores, familia de los trabajadores, la vecindad y el entorno social, entre estos el medio ambiente.

Por lo anterior, la empresa pastelera del Municipio de Puebla se encuentra interesada en mejorar la calidad y los aspectos ambientales y ha establecido la colaboración con este proyecto como parte de su programa para la adquisición de este distintivo.

“Es importante mencionar que el estudio de la RSC (Responsabilidad Social Corporativa) es un tema de relevancia en la actualidad por todas las implicaciones que tiene, desde el punto de vista académico, empresarial y legal, es por eso la importancia de continuar haciendo estudios sobre sus componentes, sus efectos

positivos y negativos, así como los alcances que se van logrando en las diversas perspectivas que se implementen, teniendo en consideración el tipo de industria y de sector donde se desarrollen” (Santos, 2016).

### **2.3. PARÁMETROS DE CALIDAD DEL AGUA RESIDUAL**

La evaluación de la calidad del agua se lleva a cabo utilizando tres indicadores: la Demanda Bioquímica de Oxígeno a cinco días ( $DBO_5$ ), la Demanda Química de Oxígeno (DQO) y los Sólidos Suspendidos Totales (SST). La  $DBO_5$  y la DQO se utilizan para determinar la cantidad de materia orgánica presente en los cuerpos de agua provenientes principalmente de las descargas de aguas residuales tanto de origen municipal como no municipal. La  $DBO_5$  determina la cantidad de materia orgánica biodegradable en tanto que la DQO mide la cantidad total de materia orgánica. El incremento de la concentración de estos parámetros incide en la disminución del contenido de oxígeno disuelto en los cuerpos de agua con la consecuente afectación a los ecosistemas acuáticos. Por otro lado, el aumento de los valores de la DQO indica presencia de sustancias provenientes de descargas no municipales. Los SST tienen su origen en las aguas residuales y la erosión del suelo. El incremento de los niveles de SST hace que un cuerpo de agua pierda la capacidad de soportar la diversidad de la vida acuática. Estos parámetros permiten reconocer gradientes que van desde una condición relativamente natural o sin influencia de la actividad humana, hasta el agua que muestra indicios de aportaciones importantes de descargas de aguas residuales municipales y no municipales, así como áreas con deforestación severa (Conagua, 2018)

### **2.4. PLANTA DE TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES**

El tratamiento de aguas residuales pretende proteger la calidad de las aguas receptoras de contaminación adicional y esto se logra reduciendo la  $DBO_5$ , SST (sólidos suspendidos totales), Nitrógeno y Fósforo total, así como Coliformes fecales. Aunque la calidad del efluente depende del tipo del medio acuático a donde sean vertidos (Torres, 2013)

## 2.5. LA CLASIFICACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS (DESCRIPCIÓN DE CADA TRATAMIENTO).

- Tratamiento preliminar (físico y/o químico): Es el proceso o procesos que preparan las condiciones del agua residual que puede someterse a posteriores procesos de tratamiento secundario biológicos convencionales. En aguas residuales urbanas esto significa la separación de materia flotante, arena y manchas de aceites. Estas materias removidas inhiben el proceso biológico y posiblemente dañarían el resto de los equipos mecánicamente. El pretratamiento puede consistir en:
  - a) Rejillas de desbaste: permite separar los sólidos flotantes de gran tamaño y proteger aguas abajo los equipos mecánicos como las bombas. Hay 4 tipos de rejillas que existen y ayudan a reducir el tamaño de las partículas de la más grande a la más fina.
  - b) Canales de desarenado: las arenas son formadas de arena inorgánica o partículas de gravilla de tamaño alrededor de 1mm, que procede del lavado de carreteras y aceras que van a parar al alcantarillado, estas arenas no suelen estar en los procesos industriales.
  - c) Flotación: La sedimentación es el proceso unitario por gravedad para separar sólidos de los líquidos. La flotación es el proceso unitario de separación basado en la capacidad para flotar de las partículas “sólidas” en una fase líquida. Los sólidos son típicamente grasas y aceites, aunque en la mayoría de estas plantas sus cantidades son insignificantes y este proceso unitario no es tan esencial. La industria láctea posee normalmente grasas entre sus residuos líquidos. Y este proceso de flotación implica el aporte de burbujas de aire por la parte inferior de las cubas de flotación. Las burbujas de aire se adhieren a la materia orgánica y la capacidad del conjunto para flotar, provoca que las partículas se eleven hasta la superficie donde son recogidas por rasquetas.
  - d) Homogenización (equilibrado): para que una depuradora pueda tratar un efluente sin dificultad es necesaria la homogenización de los parámetros

del propio afluente, tales como: del caudal, orgánica, de nutrientes, del pH; los cuales son beneficiosos para los procesos posteriores de decantación primaria y secundario biológico, ya que proporciona un caudal y carga contaminante casi constante permitiendo una operación del sistema biológico en condiciones estacionarias.

- e) Tratamiento primario (físico): se denomina clarificador, sedimentación o decantación. En este proceso unitario el agua residual se deja decantar durante un período de 2 horas en un tanque de decantación y producir así un efluente líquido clarificado en una línea y un fango líquido- sólido (fango primario) en una segunda línea. Los beneficios del tratamiento primario son: reducción de sólidos suspendidos, de la  $DBO_5$ , reducción de la cantidad de fango activado en exceso en la planta de fangos activados, separación de la materia flotante, y la homogenización parcial de los caudales y carga orgánica.
- f) Tratamiento secundario (biológico): La reducción de los compuestos orgánicos presente en el agua residual, acondicionada previamente mediante tratamiento primario, se realiza exclusivamente por procesos biológicos. Este proceso reduce o convierte la materia orgánica finamente dividida y/o disuelta, en sólidos sedimentables floculantes que puedan ser separados por sedimentación en tanques de decantación. Los procesos biológicos más utilizados son los lodos activados y filtros percoladores. Son muchas las modificaciones de estos procesos que se utilizan para hacer frente a los requerimientos específicos de cada tratamiento. Asimismo, dentro de este grupo se incluyen a las lagunas de estabilización y airadas, así como el tratamiento biológico empleando oxígeno puro y el tratamiento anaeróbico. Los tratamientos biológicos de esta categoría tienen una eficiencia de remoción de la  $DBO$  entre el 85% al 95%.
- g) Tratamiento avanzado o terciario (físico y/o químico y/o biológico): Tiene como objetivo complementar los procesos anteriormente indicados para lograr efluentes más puros, con menor carga contaminante y que pueda

ser utilizado para diferentes usos como recarga de acuíferos, recreación, agua industrial, entre otros. Las sustancias o compuestos comúnmente removidos son: Fosfatos y nitratos, Huevos y quistes de parásitos, sustancias tóxicas activas, algas, bacterias y virus (desinfección), radionúclidos, sólidos totales y disueltos, temperatura. Los procesos de tratamiento de esta categoría están conformados por procesos físicos, químicos y biológicos (Avila Peltroche, 2015).

## **2.6. INDICADORES MICROBIOLÓGICOS DE CONTAMINACIÓN DE FUENTES DE AGUA**

**NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-002-SEMARNAT-1996, QUE ESTABLECE LOS LÍMITES MÁXIMOS PERMISIBLES DE CONTAMINANTES EN LAS DESCARGAS DE AGUAS RESIDUALES A LOS SISTEMAS DE ALCANTARILLADO URBANO O MUNICIPAL.**

Esta Norma Oficial Mexicana establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a los sistemas de alcantarillado urbano o municipal con el fin de prevenir y controlar la contaminación de las aguas y bienes nacionales, así como proteger la infraestructura de dichos sistemas, y es de observancia obligatoria para los responsables de dichas descargas.

Condiciones particulares para descargas al alcantarillado urbano o municipal. El conjunto de parámetros físicos, químicos y biológicos y de sus límites máximos permisibles en las descargas de aguas residuales a los sistemas de alcantarillado urbano o municipal, establecidos por la autoridad competente, previo estudio técnico correspondiente, con el fin de prevenir y controlar la contaminación de las aguas y bienes nacionales, así como proteger la infraestructura de dichos sistemas. En esta norma también se especifica el número de muestras que deben tomar de acuerdo a la capacidad de la Planta de tratamiento de agua. Esto se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Número de muestras para el análisis de agua residual de acuerdo a las horas de tratamiento.

FRECUENCIA DE MUESTREO			
Horas por día que opera el proceso generador de la descarga	Número de muestras	Intervalo máximo entre toma de muestras simples (horas)	
		Mínimo	Máximo
Menor que 4	Mínimo 2	-	-
De 4 a 8	4	1	2
Mayor que 8 y hasta 12	4	2	3
Mayor que 12 y hasta 18	6	2	3
Mayor que 18 y hasta 24	6	3	4

La NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-003-SEMARNAT-1997, QUE ESTABLECE LOS LÍMITES MÁXIMOS PERMISIBLES DE CONTAMINANTES PARA LAS AGUAS RESIDUALES TRATADAS QUE SE REUSEN EN SERVICIOS AL PÚBLICO, es la que reporta a los coliformes fecales como contaminantes y sus límites máximos. Estos límites los podemos ver en la Tabla 3 a continuación.

Tabla 3. Límites máximos permisibles de contaminantes. Tomado de: NOM-003-SEMARNAT-1997.

LÍMITES MÁXIMOS PERMISIBLES DE CONTAMINANTES					
Tipo de reúso	Promedio mensual				
	Coliformes Fecales NMP/100mL	Huevos de Helminto (h/L)	Grasas y aceites (mg/L)	DBO <sub>s</sub> mg/L	SST mg/L
Servicios al público con contacto directo	240	≤1	15	20	20
Servicios al público con contacto indirecto u ocasional	1,000	≤5	15	30	30

## 2.7. MICROBIOMAS DE LAS AGUAS RESIDUALES, SU IMPACTO AMBIENTAL Y EN LA SALUD PÚBLICA.

La industria de alimentos contribuye a proporcionar alimentos para las poblaciones, pero sus aguas residuales pueden ser una fuente de transmisión de

enfermedades infecciosas y un riesgo para la salud humana por la contaminación con microorganismos patógenos de descargas (Halter & Steffen, 2016, Hernández, et al, 2008, OMS, 2020, Ikehata, 2013)

Los biosólidos se clasifican en clase A y clase B por la concentración de patógenos o indicadores fecales dependiendo del tipo de tratamiento de lodos empleado. La clase A se define libre de patógenos (Principalmente *Salmonella* sp), la clase B puede contener patógenos que son pasados al tratamiento de digestión anaerobia mesofílica y termofílica (Macías, J. G. L., & Guadalajara, J., 2013)

Hay diversos estudios en donde se han identificado diversos patógenos como *Listeria*, *Salmonella* y *Shigella* en aguas residuales de algunas empresas de alimentos y acuacultura (Klase, Lee, Liang, Jinnam, & Young, 2018).

Fu, Jiang, & Liu en 2015, demuestran que los géneros *Salmonella* sp. y *Shigella* sp., fueron microorganismos bacterias patógenos recuperados de digestiones anaeróbicas en las aguas residuales y principalmente del prensado de lodos secos. (Fu, Jiang, & Liu, 2015).

El uso de las aguas residuales pos-tratadas en el sector agrícola, ha sido reportado por Castillo et al en 2003 con el surgimiento de dos brotes de gastroenteritis.

A *Listeria monocytogenes* se le ha detectado de individuos que consumieron vegetales irrigados con aguas residuales (Halter & Steffen, 2016).

### **3. PREGUNTA CIENTÍFICA**

¿Cuál será la calidad microbiológica y fisicoquímica del agua residual y tratada en el punto de salida de una PTAR de una industria pastelera?

### **4. OBJETIVOS**

#### **4.1. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la calidad microbiológica y fisicoquímica del agua residual tratada en una Planta de Tratamiento de Agua Residual (PTAR), de una industria pastelera en la ciudad de Puebla incluida como parte de su programa de responsabilidad social.

#### **5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Determinar el cumplimiento la normatividad mexicana en los valores límites de indicadores microbiológicos: coliformes totales, coliformes fecales y *E. coli* en el agua residual y tratada de la PTAR de la industria pastelera.

2. Demostrar en el punto de salida del agua residual y tratada de la PTAR, la ausencia bacterias patógenas: *Salmonella*, *Listeria*, *Shigella*, y *Brucella* sp, usando un método molecular.

3. Analizar los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos de tres muestreos del agua residual de la PTAR para establecer la eficiencia del tratamiento primario que se realiza en esa industria y como parte de su programa de responsabilidad social

### **5. HIPÓTESIS**

Ho= La calidad microbiológica y fisicoquímica del agua residual y tratada en el punto de salida de una PTAR de una industria pastelera cumple la normatividad mexicana y está libre de patógenos.

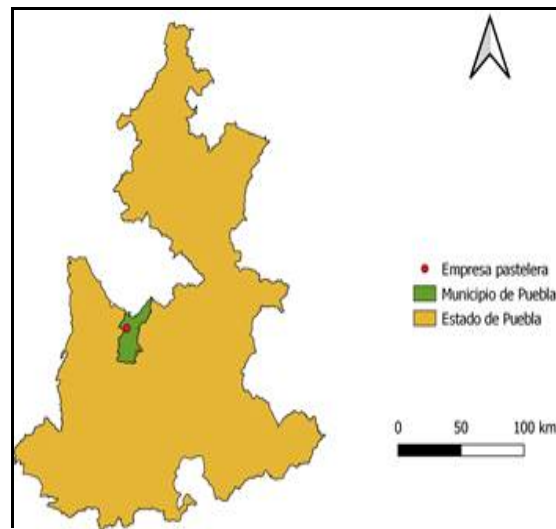
### **6. MÉTODOS Y TIPO DE INVESTIGACIÓN**

El tipo de investigación fue transversal y por diseño experimental.

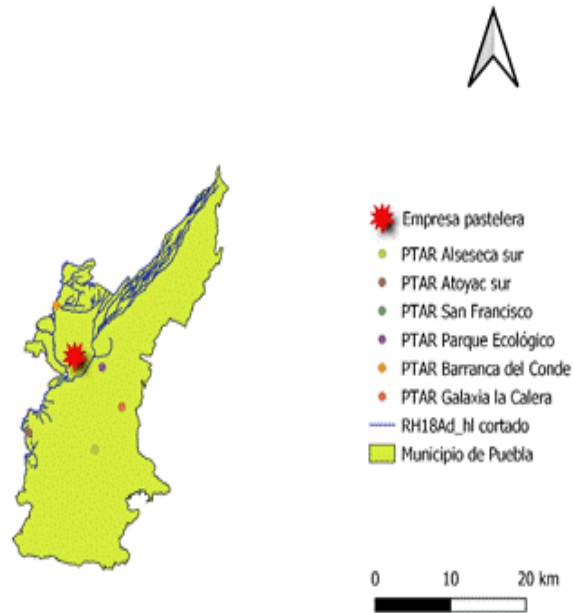
## MÉTODOS

### 6.1. EMPRESA PASTELERA COMO ZONA DE ESTUDIO.

La empresa pastelera está ubicada en el municipio de Puebla, pertenece al municipio N° 114 del Estado de Puebla. Cuenta con 28 años de trayectoria, actualmente está conformada con una fábrica, dos centros de distribución, un corporativo, más de 500 colaboradores, un concepto de cafetería “Sweet Factory” y más de 130 sucursales, ubicando los Estados de Puebla, Tlaxcala, Veracruz, Morelos, Ciudad de México e Hidalgo.



**Figura 1. Ubicación de la zona de estudio.** Empresa pastelera del municipio de Puebla (N°114) del Estado de Puebla. Fuente: Comisión Nacional para el Conocimiento y el Uso de Biodiversidad (CONABIO), Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI).



**Figura 2. Plantas tratadoras municipales de Puebla.** RH18Ad\_hl corresponde a las líneas de flujo (Red hidrográfica) de la Región Hidrológica número 18 que atraviesa una parte de la Ciudad de Puebla. Fuente: Comisión Nacional para el Conocimiento y el Uso de Biodiversidad (CONABIO), Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI).

## 6.2. LA INDUSTRIA PASTELERA POBLANA.

La empresa pastelera constituye una microempresa familiar mexicana con más de 20 años de experiencia en la repostería, que se ha extendido en 6 Estados de la República Mexicana (Puebla, Tlaxcala, Veracruz, Morelos, Hidalgo y Ciudad de México). La actividad de esta empresa se refiere al proceso de producción, distribución y comercialización de pasteles y postres artesanales a través de la venta directa a los clientes en un local comercial. La producción y el nivel de producción, aunque en escala pequeña deberán garantizar una adecuada producción. Las materias primas que manejan son variables y se pueden clasificar por grupos:

- a) Leche, fórmulas lácteas, queso, crema, queso crema.
- b) Yema pasteurizada.
- c) Harina de trigo y harina enriquecida.

- d) Grasas como mantequilla, margarina, manteca de cacao, sólidos de cacao, chocolate blanco, grasas vegetales.
- e) Almidones y féculas.
- f) Frutas de almíbar (durazno, mango y cerezas).

En general la misión de la industria pastelera es la de elaborar y comercializar pasteles con calidad e higiene, satisfaciendo los gustos de los clientes a través de su gama de sabores, buscando siempre cumplir con las exigencias del mercado consumidor. Sin embargo, dentro de los valores de la empresa, el agua residual generada en el proceso y que se elimina al drenaje municipal, debe de cumplir con un tratamiento.

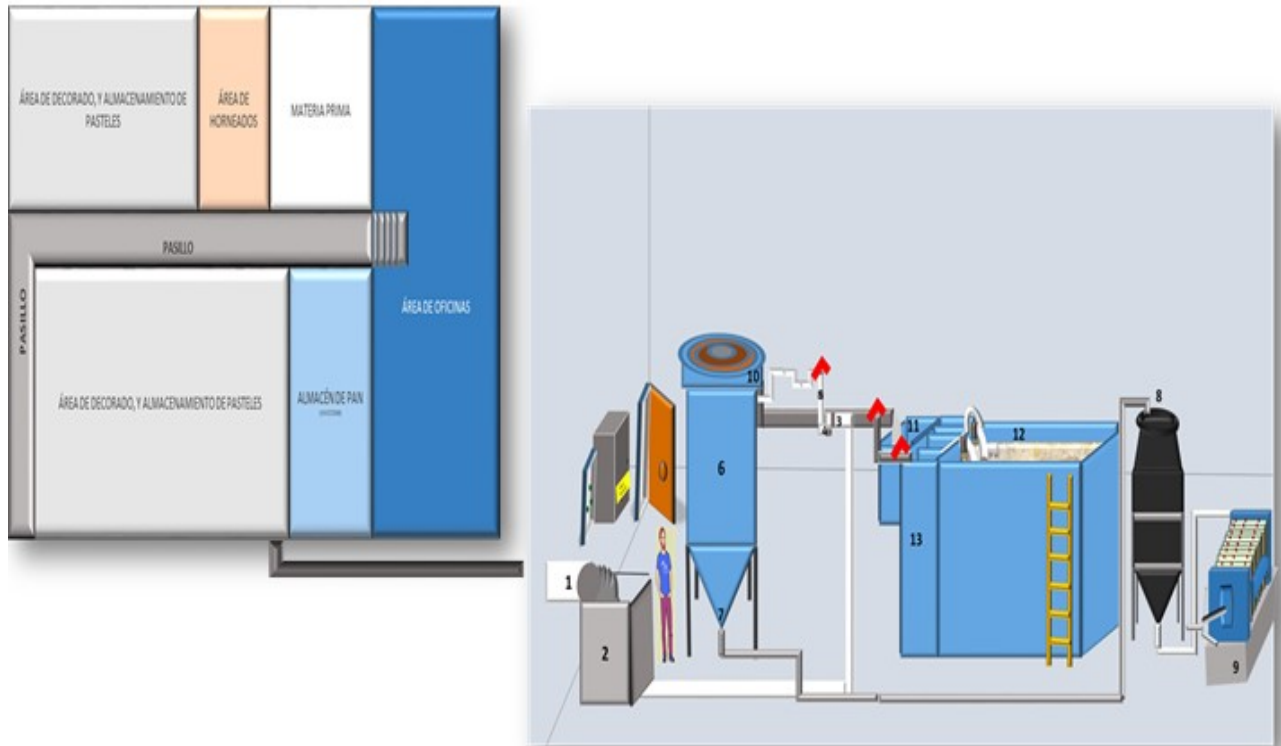
La SEMARNAT en el documento “El medio ambiente en México (2013-2014) en el apartado 6.2.3. correspondiente a aguas residuales, establece que la descarga de aguas residuales domésticas, industriales, agrícolas y pecuarias sin tratamiento provoca la contaminación de los cuerpos de agua receptores disminuyendo la calidad de las aguas superficiales y subterráneas, poniendo en riesgo la salud de la población y la integridad de los ecosistemas” (Conagua, 2013).

Para la remoción de los contaminantes en las aguas residuales municipales existen diversos procesos de tratamiento. En el país los procesos de tratamiento de aguas residuales municipales incluyen lodos activados, lagunas de estabilización, primario avanzado, lagunas aireadas, filtros biológicos, dual y otros. A través de los sistemas de tratamiento, cada año se remueven cerca de 0.65 millones de toneladas de DBO<sub>5</sub> de los 2 millones de toneladas que se generan (Conagua, 2011, 2012)

La contaminación microbiana en una industria productora de pasteles puede tener múltiples fuentes, dependiendo de las materias primas utilizadas como es el caso de lácteos. Por ello, aparte del tratamiento fisicoquímico de las aguas residuales, para una posible reutilización se deben de eliminar los patógenos dependiendo del propósito del agua recuperada.

En la empresa pastelera se encuentra una planta de tratamiento de agua residual pequeña, la cual cubre sus necesidades, la cual se describe en la Figura 3.

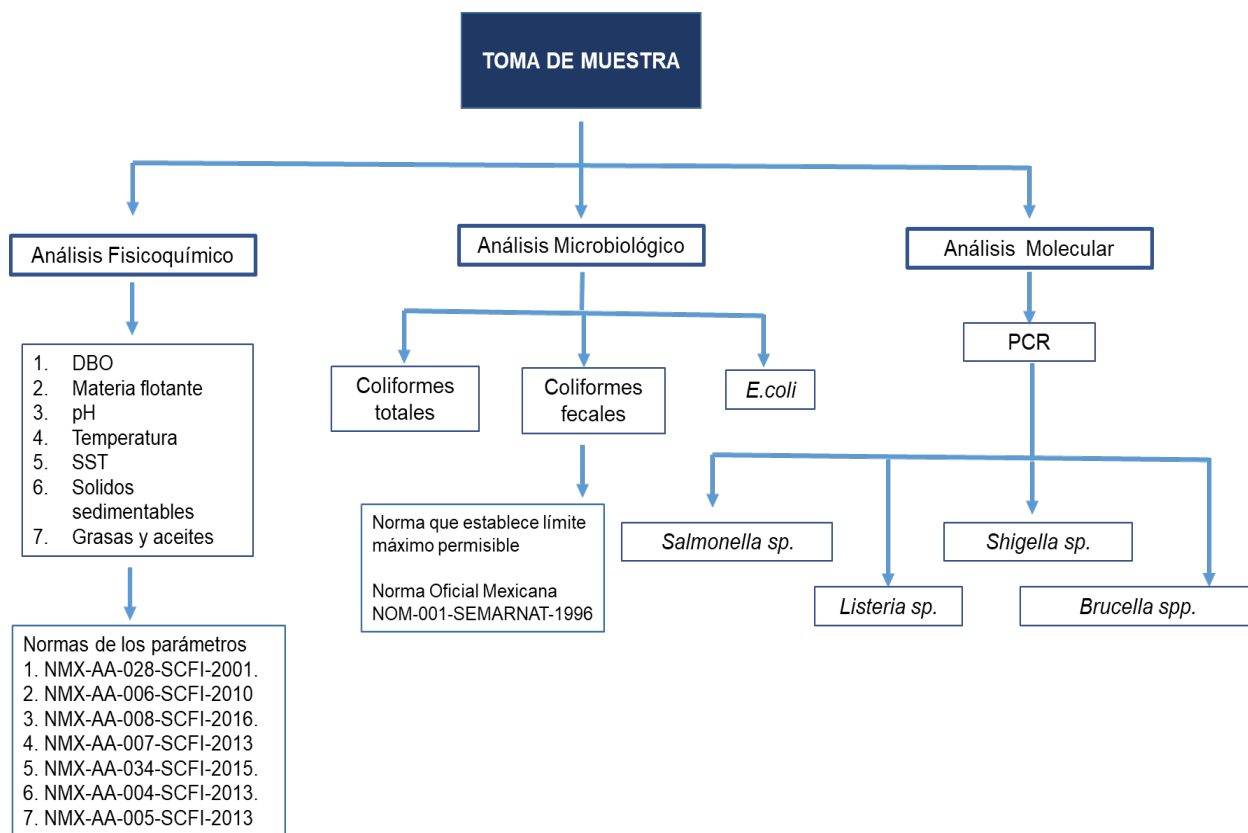
Se observa que a partir del área de procesos (materia prima, horneado, decorado y empaquetado) y algunas oficinas administrativas están relacionadas para la descarga de las aguas residuales de la empresa que reciben un tratamiento. Cada área de procesos tiene de una a 3 tarjas las cuales cuentan con un equipo de trampa de grasas, en donde se aplican enzimas cada tercer día para su pronta degradación; el agua residual llega al siguiente proceso de aguas residuales el cual empieza con: la descarga del agua hacia 2) el cárcamo, el cual tiene un caudal de  $6\text{m}^3/\text{s}$ , posteriormente llegar a los siguientes pasos; 3) adición de sosa para neutralizar el pH del agua residual, ya que por los desechos que recibe llega a ser muy ácida y puede afectar en los procesos siguientes; 4) la aplicación de un polímero; 5) la adición de un coagulante (sales de hierro, cal, aluminio), la cual provoca una floculación de la materia fina en suspensión en flóculos más propensos a la decantación; 6) clarificador primario, sedimentador o decantador, el agua se deja decantar aproximadamente 2 horas y se produce un; 10) efluente líquido clarificado en una línea y un fango líquido- sólido, produciendo un efluente líquido de calidad aprovechable para la etapa del tratamiento biológico secundario, mientras tanto en 7) la tolva central se extrae el lodo sedimentado que van directamente a un 8) manejo de lodos, a través de un digestor, el cual se le inyecta polímero para una consistencia espesa, luego va a 9) la máquina de prensado para secar el lodo, el cual es desechado a residuos sólidos y el agua clarificada se va al caudal de salida. Mientras tanto 10) el agua clarificada del decantador primario pasa directamente al 11 y 12) proceso secundario (biológico) donde se reduce el valor de la  $\text{DBO}_5$ , biodegrada la materia orgánica en productos no contaminantes. Debe de estar bien oxigenado para que no proporcione una fuente de alimento para otras bacterias aerobias en el medio acuático receptor. Se considera que es un sistema de cultivos en suspensión, 13) cámara de decantación secundaria, impidiendo el paso de sólidos en suspensión más pequeños, para ser descargada al caudal de salida.



**Figura 3. Diagrama del proceso de producción de la empresa pastelera y descarga de aguas residuales a la planta de tratamiento**

### **6.3. METODOLOGÍA.**

La metodología que se empleó para llevar a cabo la evaluación de la PTAR se esquematiza en la figura 2. Los análisis realizados a las muestras de agua residual de la PTAR fueron fisicoquímicos, microbiológicos y moleculares.

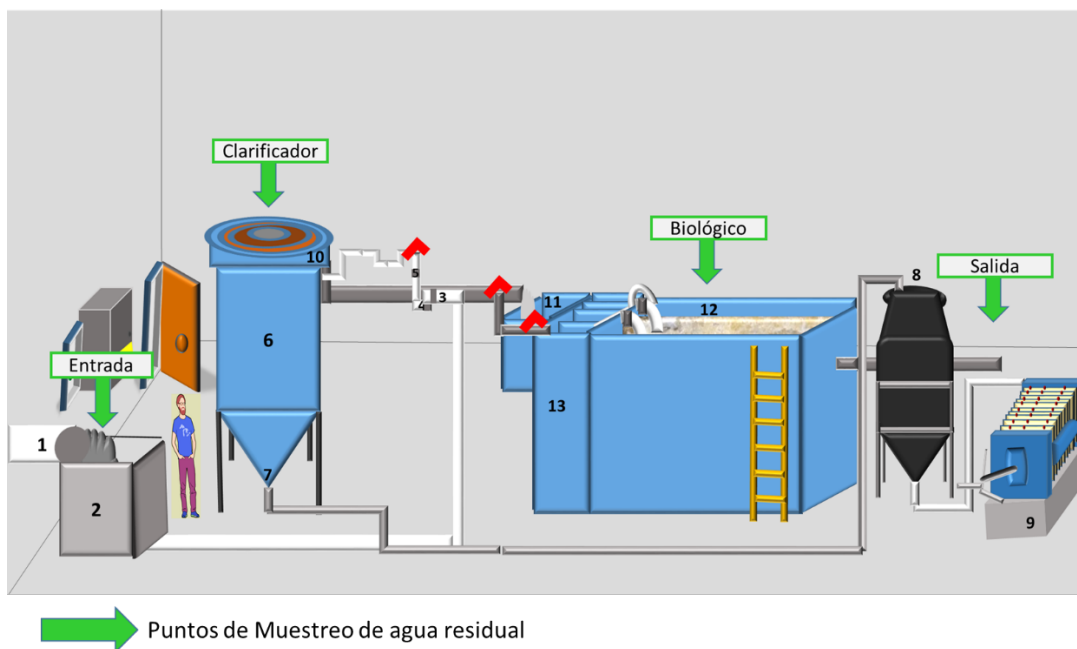


**Figura 4. Diagrama de flujo de la metodología que se siguió para el análisis de las aguas residuales provenientes de la PTAR de la Empresa pastelera en estudio.**

#### **6.4. MUESTREO DEL AGUA RESIDUAL DE LA PTAR EN ESTUDIO.**

Previo al muestreo de agua, se hizo una inspección y evaluación de las características de producción, de las actividades de producción y el tipo de planta de tratamiento de aguas con la que cuenta la empresa pastelera para establecer la influencia en la calidad sanitaria del agua residual.

Los puntos de muestreo se representan con flechas de color verde en la figura 2, las que corresponden a: 1) Cárcamo, 2) clarificador, 3) reactor secundario, 4) caudal de salida (figura 5).



**Figura 5. Puntos de muestreo del agua residual en la planta de tratamiento de aguas de la empresa pastelera. 1: entrada, 2: Clarificador, 3: Biológico, 4: Salida.**

Las muestras se colectaron tomando como base la norma mexicana NMX-AA-003-SCFI-1980 "AGUAS RESIDUALES. - MUESTREO", donde se indica el tipo de materiales y equipo que se debe de emplear para cualquier tipo de muestreo, al igual que la identificación de las muestras.

Las muestras de agua fueron colectadas en frascos de 1 L de polietileno con tapas herméticas y fueron transportadas a 4°C para su conservación y se procesaron antes de las 72 h. Para llevar a cabo el muestreo se usaron guantes y cubrebocas como lo establece la normatividad. Cada uno de los frascos que contenían las muestras fueron etiquetados con los siguientes datos para identificar la descarga: número de muestra, fecha y hora de muestreo, temperatura, nombre del responsable del muestreo.

Se llevaron a cabo tres muestreos en tres diferentes tiempos y las muestras de agua que se emplearon para todos los análisis fueron muestras compuestas a partir de tres muestras tomadas a diferentes horas de la mañana en función del horario de funcionamiento de la PTAR. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

## **6.5. ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS**

Para llevar a cabo los análisis fisicoquímicos de la PTAR, la encargada de realizarlos fue la Empresa Pastelera en estudio para lo cual envió las muestras a un Laboratorio especializado, excepto para los valores de pH y de temperatura que fueron realizados al momento de la toma de muestra. Los análisis fisicoquímicos que se llevaron a cabo fueron:

1. Demanda Bioquímica de Oxígeno, en base a la norma mexicana NMX-AA-028-SCFI-2001.
2. Materia Flotante de acuerdo a la norma mexicana NMX-AA-006-SCFI-2010.
3. Determinación de pH tomando como referencia la norma mexicana NMX-AA-008-SCFI-2016.
4. Media Aritmética de la medición de la temperatura por la norma mexicana NMX-AA-007-SCFI-2013.
5. Sólidos Suspendidos Totales usando la norma mexicana NMX-AA-034-SCFI-2015.
6. Medición de sólidos sedimentables mediante la norma mexicana NMX-AA-004-SCFI-2013.
7. Medición de grasas y aceites Promedio Ponderado a través de la norma mexicana NMX-AA-005-SCFI-2013.

Los resultados de los muestreos fueron recopilados en tablas de Excel para su posterior análisis.

## **6.6. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD DE LA DESCARGA DE AGUAS RESIDUALES.**

En cuanto a los análisis microbiológicos que se llevaron a cabo para conocer la calidad microbiológica de las descargas de aguas residuales en cada uno de los puntos de muestreo, se utilizó la cuantificación de los organismos coliformes totales

(OCT), los organismos coliformes fecales (OCF) y de *Escherichia coli*, utilizando la técnica del número más probable (NMP).

Los resultados para los organismos coliformes fecales obtenidos fueron comparados con los límites establecidos por la Norma Oficial Mexicana NOM-001-SEMARNAT-1996, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales, también se determinan los contaminantes patógenos a través de los coliformes fecales, para los cuales el límite máximo permisible (LMP) para las descargas de aguas residuales vertidas a aguas y bienes nacionales, es de 1,000 y 2,000 como número más probable (NMP) de coliformes fecales por cada 100 ml para el promedio mensual y diario, respectivamente.

#### **6.6.1. COLIFORMES TOTALES, FECALES y *E. coli* POR LA TÉCNICA DEL NMP.**

La enumeración de organismos coliformes totales, organismos coliformes fecales (termotolerantes) y *Escherichia coli*, se llevó a cabo por el método del número más probable en tubos múltiples, de acuerdo a la NMX-AA-042-SCFI-2015 ANÁLISIS DE AGUA - ENUMERACIÓN DE ORGANISMOS COLIFORMES TOTALES, ORGANISMOS COLIFORMES FECALES (TERMOTOLERANTES) Y *Escherichia coli* – MÉTODO DEL NÚMERO MÁS PROBABLE EN TUBOS MÚLTIPLES. Para ello se prepararon tres series sucesivas de 3 tubos con caldo lactosado, una de doble concentración y las otras dos de concentración sencilla. Inoculando con 10, 1 y 0.1 mL, los tubos se incubaron a una temperatura de 35 °C durante 24-48 horas. Después de 24 horas de incubación se efectuó una primera lectura para observar si había tubos positivos, es decir, si existía producción de gas en la campana Durham, en caso de ser negativos, se volvieron a incubar 24 h más, al término del periodo de incubación a todos los tubos positivos, se les hicieron las pruebas confirmatorias para coliformes totales y coliformes fecales (Figura 5).

Si al término de las 48 h de incubación no se observaba turbidez ni producción de gas, los tubos se tomaron como negativos y se reportó como ausencia de coliformes totales y fecales en la muestra analizada.

#### **6.6.2. PRUEBA CONFIRMATORIA PARA COLIFORMES TOTALES.**

Se sembraron tubos con caldo Lactosa Bilis Verde Brillante uno por cada uno de los tubos que salieron positivos de la prueba presuntiva, la inoculación se realizó mediante una asada para cada tubo, se incubaron a  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se examinaron para la producción de gas en un periodo de 24 h a  $48\text{ h} \pm 3\text{ h}$ . Después de la incubación se observó la presencia de turbidez y de gas. Cuando se observaba turbidez y producción de gas, la prueba se consideraba positiva. se anotó el número de tubos positivos para cada dilución y posteriormente se comparó con las tablas de NMP o se realizó el cálculo del NMP. Si en ninguno de los tubos había producción de gas, aun cuando hubiera turbidez, se consideraron negativos, estableciéndose el Código 0,0,0 para efecto del cálculo del NMP.

#### **6.6.3. PRUEBA CONFIRMATORIA PARA COLIFORMES FECALES:**

A partir de cada uno de los tubos que resultaron positivos en la prueba presuntiva, se inocularon con una asada, el mismo número de tubos conteniendo caldo E.C. (*Escherichia coli*), se incubaron a  $44,5\text{ }^{\circ}\text{C} (\pm 0,2\text{ }^{\circ}\text{C})$  durante  $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$ , y al término de este periodo se observó la presencia de turbidez y gas, si existían ambas condiciones la prueba era positiva y se anotó el número de tubos positivos para posteriormente hacer el cálculo del NMP. Si no se observaba producción de gas, aun cuando hubiera turbidez, se reportó la ausencia de coliformes fecales.

#### **6.6.4. PRUEBA CONFIRMATORIA PARA *E. coli***

Para confirmar la presencia de *E. coli*, se inocularon tubos conteniendo agua peptonada y se incubaron a  $44,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,2\text{ }^{\circ}\text{C}$  por  $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$ , después del periodo de incubación se adicionaron de 0,2 mL a 0,3 mL del equivalente al reactivo de Kovac a todos los tubos resembrados; el desarrollo de una coloración roja en la parte superior del tubo después de una agitación suave, denotó la producción de indol,

característica de la presencia de *E. coli*, para enumerar el NMP/100 mL de *E. coli* se tomó en cuenta la serie de tubos que resultaron positivos y se comparó con la tabla de valores de la normatividad mexicana.

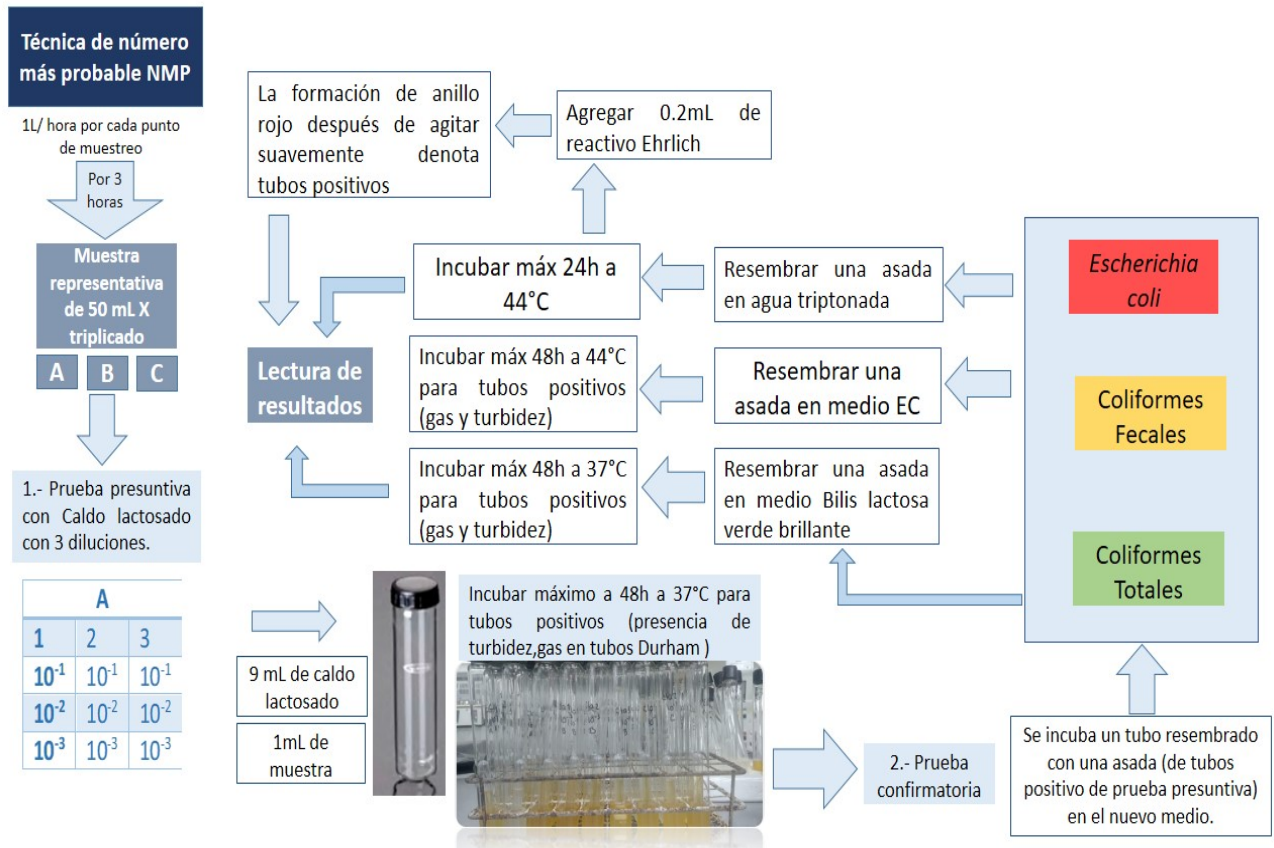


Figura 6. Diagrama de flujo de la metodología de NMP para análisis de agua. Fuente: NMX-AA-042-SCFI-2015.

## 6.7. PRUEBAS MOLECULARES PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES PATÓGENAS: REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

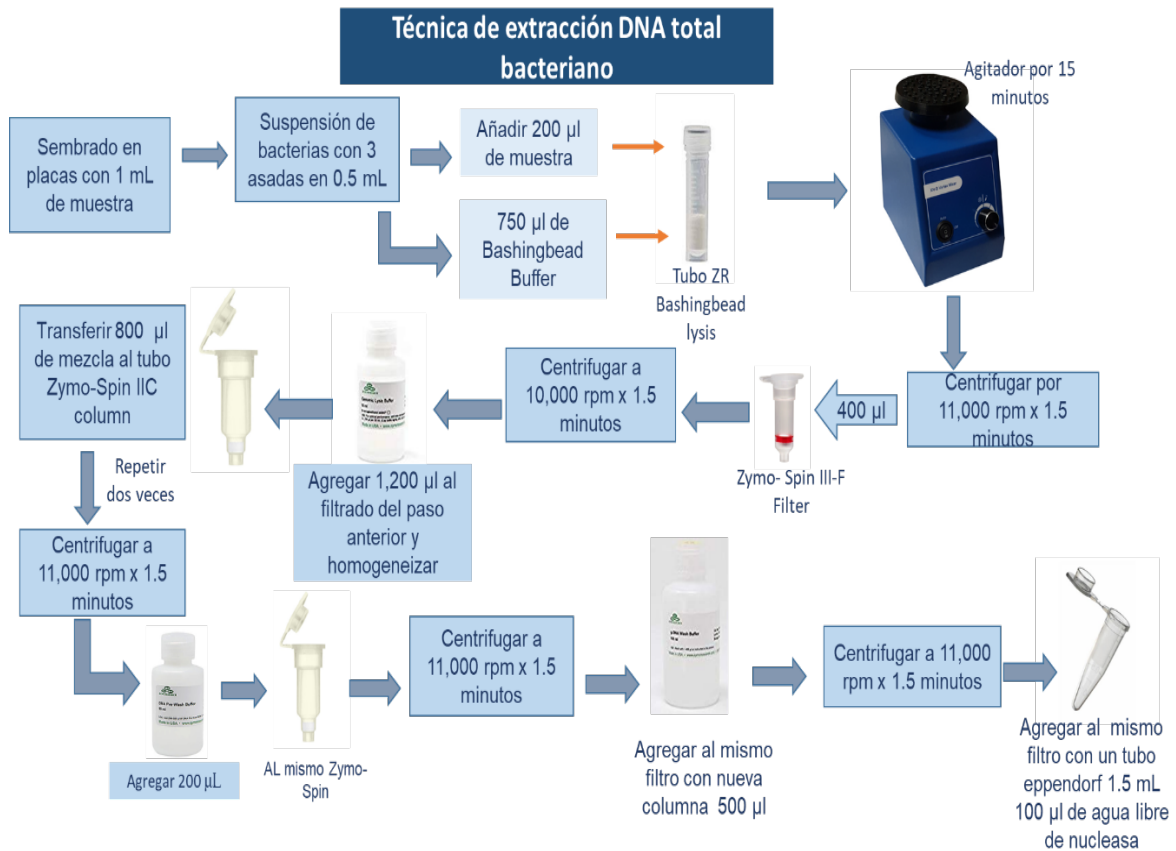
Los microorganismos para los cuales se empleó la reacción en cadena de la polimerasa fueron patógenos comunes en alimentos y por ser una empresa pastelera los más representativos de este grupo de alimentos: *Listeria monocytogenes*, *Salmonella sp*, *Shigella sp* y *Brucella sp*.

### 6.7.1. Extracción de DNA a partir de muestras de agua

La extracción de DNA se inició tomando en cuenta lo reportado por Healy-Profitos *et al.* (2016), para ello se colocó un filtro de membrana en un tubo estéril de 2 ml con 0,6 mg de perlas de vidrio estériles (0,1 mm y 0,5 mm de diámetro con 0,3 mg cada una). Se agitaron las perlas con un agitador de tubos a 13,200 oscilaciones / min durante 5 min. Después de una breve centrifugación (10.000 g durante 1 minuto), el sobrenadante se transfirió a un tubo estéril de microcentrifuga de 2 ml, seguido de la extracción del DNA y posteriormente se siguió el protocolo del kit Quick-DNA™ Fungal/Bacterial Miniprep Kit, de la marca Zymo Research (Figura 6), El DNA obtenido se corrió en un gel de agarosa al 1% y la concentración y la calidad de DNA se determinaron utilizando un NanoDrop (Klase G, *et al.*, 2019, Healy-Profitos, *et al.*, 2016).

#### **6.7.2. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA.**

Para detectar a los microorganismos patógenos en estudio se eligieron genes blanco característicos de género para detectar cualquier especie patógena presente. Los iniciadores empleados, la secuencia de los iniciadores, los genes blancos y el tamaño de los amplicones esperados, para cada uno de los microorganismos detectados se enlistan en la tabla 3.



**Figura 7. Diagrama de flujo de técnica de extracción de DNA**

El volumen total de la reacción fue de 25 µL, conteniendo 12.5 µL de Taq polimerasa (GoTaq® Green Master Mix 2x), 0.1 µL del iniciador sentido y 0.1 µL del iniciador antisentido, 3 µL del DNA extraído del agua y 9.3 µL de agua estéril para PCR, para el caso de *Brucella* se emplearon 5 µL. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador marca miniPCR™ con un programa diferente para cada uno de los microorganismos.

**Tabla 4. Secuencia de los iniciadores genes blanco y tamaño de los amplicones para los diferentes microorganismos detectados en este estudio.**

Patógeno	Gene blanco	Nombre iniciadores	Secuencia de iniciadores (5'-3')	Tamaño amplicon (bp)	Referencia
<b><i>Listeria monocytogenes</i></b>	<i>hly A</i>	<i>hlyA</i> sentido	GCA TCT GCA TTC AAT AAA GA	237	Fabiola Avelino Flores CICM-ICUAP, BUAP
		<i>hlyA</i> antisentido	TGT CAC TGC ATC TCC GTG GT		
<b><i>Salmonella sp</i></b>	<i>inv A</i>	<i>Inv A</i> sentido	GTG AAA TTA TCG CCA CGT TCG GGC AA	284	Burkhard M., et al (2003)
		<i>Inv A</i> antisentido	TCA TCG CAC CGT CAA AGG ACC		
<b><i>Shigella sp</i></b>	<i>gtrI</i>	<i>gtrI</i> sentido	GCA GCA CTC TTT GAT GCC GGG CTG ATG CCG TAG TCG TCA CT	100	Hyun-Joong, et al (2017)
		<i>gtrI</i> antisentido	CCC GTT CGG TCC TCT CCC AAA ACG GGC CCG GAG CTA AAG TT		
<b><i>Brucella sp</i></b>	bp26	BMEI0535 sentido	GCG CAT TCT TCG GTT ATG AA	450	López-Goñi et al (2008)
		BMEI0536 antisentido	CGC AGG CGA AAA CAG CTA TAA		

Para *L. monocytogenes* se empleó una desnaturalización inicial del DNA molde a 94° C durante 4 minutos, seguido de 30 ciclos consecutivos que incluyen una desnaturalización a 94°C por un minuto, la alineación de los iniciadores a una temperatura de 52°C durante 1 minuto, y una extensión a 72°C durante un minuto, con un ciclo de extensión final a 72°C durante 5 minutos (Báez-Moreno G. K. & Avelino-Flores, 2018).

Para obtener el amplicón de *invA* para la detección de *Salmonella sp* se empleó el programa de desnaturalización inicial a 95°C por 1 min, 37 ciclos formados de desnaturalización a 95°C por 30 s, alineamiento a 64°C por 30 s y extensión a

72°C por 30 s, la extensión final fue a 72°C por 4 minutos (Caltzalco de Bernardo M & Avelino-Flores F, 2015).

La PCR para la amplificación de *grl* de *Shigella* se llevó a cabo bajo el programa de amplificación siguiente: desnaturalización inicial de 95 °C durante 7 min, 30 ciclos de la siguiente secuencia desnaturalización 95 °C durante 1 min, alineamiento a 52 °C durante 1 min y extensión a 65 °C durante 8 min, y una extensión final a 65 °C durante 10 min (Hyun-Joong, et al, 2017).

Para la amplificación de bp26 del género *Brucella* se empleó el siguiente programa de amplificación desnaturalización inicial de 95 °C durante 180 s, 30 ciclos de la siguiente secuencia desnaturalización 95 °C durante 60 s, alineamiento a 50 °C durante 45 s y extensión a 72 °C durante 180 s, y una extensión final a 72 °C durante 360 s. (Ramos- Ramírez L. C. & Castañeda Roldán E. I, 2020)

### **6.7.3. Visualización de los productos de PCR por Electroforesis**

Los productos de PCR fueron visualizados por medio de una electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% (p/v), separados a 90 volts durante 60 minutos, en tampón TAE 1X (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA pH 8 ± 0.2), dicho gel se tiñó en bromuro de etidio (5 µg/ml) durante 10 minutos para poder visualizar y fotografiar los amplicones en el transiluminador UV. Como marcador de tamaño molecular se utilizó el marcador de DNA 100 pb Plus (Fermentans Thermo Scientific).

### **6.7.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO POR MODELO LINEAL Y PRUEBA DE TUKEY.**

Sirve para probar todas las diferencias entre medias de tratamiento de una experiencia. Se calcula el valor crítico de todas las comparaciones por pares. Se obtiene el valor estándar de cada promedio, se obtiene el valor de  $\alpha$ . Calcular la diferencia de las medias y realizar las comparaciones con el valor crítico. La prueba de Tukey es la más aplicada para este tipo de experimentos (Fallas. J. 2012).

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### RESULTADOS DE ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS DEL CAUDAL DE SALIDA DE LA PTAR DE LA EMPRESA PASTELERA

Los resultados del análisis fisicoquímico que realizó la empresa externa a la industria pastelera, se muestran en las tablas 5 a 7. Se marca en color los parámetros que no cumplen con las correspondientes normas con las que se comparan los valores obtenidos.

**Tabla 5. Resultados de análisis fisicoquímicos del 04 de abril 2019**

DATOS RECOLECTADOS DE ABRIL 2019						
Parámetros analizados	Unidades	Concentración obtenida	Norma	Excedentes	Declaración de la conformidad	Método de Prueba
<b>Demanda Bioquímica de Oxígeno</b>	mg/L	<b>960</b>	<b>150</b>	<b>910</b>	<b>No Cumple</b>	<b>NMX-AA-028-SCFI-2001</b>
Materia Flotante	A/P	A	Ausente	--	Cumple	NMX-AA-006-SCFI-2010
Determinación de pH	Unidades	8.9	5.5-10	--	Cumple	NMX-AA-008-SCFI-2016
Media Aritmética de la medición de la temperatura	°C	24	40.00	--	Cumple	NMX-AA-007-SCFI-2013
Sólidos Suspendidos Totales	mg/L	58	125.0	--	Cumple	NMX-AA-034-SCFI-2015
<b>Medición de sólidos sedimentables</b>	mg/L	<b>0.2</b>	<b>7.5</b>	<b>1,5</b>	<b>No Cumple</b>	<b>NMX-AA-004-SCFI-2013</b>
Medición de grasas y aceites Promedio Ponderado	mg/L	<6	75	--	Cumple	NMX-AA-005-SCFI-2013

Observación: Caudal promedio de 0.25 l/s, muestreo conforme a la norma NMX-AA-003-1980

Nota: A/P(Ausencia/Presencia), La declaración de la conformidad se basa en los Límites máximos permisibles de los contaminantes que se encuentran en la NOM-002-SEMARNAT-1996 DESCARGAS DE AGUAS RESIDUALES A LOS SISTEMAS DE ALCANTARILLADO URBANO O MUNICIPAL.

**Tabla 6. Resultados de análisis fisicoquímicos del 03 de julio de 2019**

<b>DATOS RECOLECTADOS DE JULIO 2019</b>						
<b>Parámetros analizados</b>	<b>Unidades</b>	<b>Concentración obtenida</b>	<b>Norma</b>	<b>Excedentes</b>	<b>Declaración de la conformidad</b>	<b>Método de Prueba</b>
<b>Demanda Bioquímica de Oxígeno</b>	<b>mg/L</b>	<b>500</b>	<b>150</b>	<b>350</b>	<b>No cumple</b>	<b>NMX-AA-028-SCFI-2001</b>
Materia Flotante	A/P	A	Ausente	--	Cumple	NMX-AA-006-SCFI-2010
Determinación de pH	Unidades	8.3	5.5-10	--	Cumple	NMX-AA-008-SCFI-2016
Media Aritmética de la medición de la temperatura	°C	22	40	--	Cumple	NMX-AA-007-SCFI-2013
Sólidos Suspendidos Totales	mg/L	66	125	--	Cumple	NMX-AA-034-SCFI-2015
<b>Medición de sólidos sedimentables</b>	<b>mg/L</b>	<b>4</b>	<b>7.5</b>	<b>1.5</b>	<b>No Cumple</b>	<b>NMX-AA-004-SCFI-2013</b>
Medición de grasas y aceites Promedio Ponderado	mg/L	< 6	75	--	Cumple	NMX-AA-005-SCFI-2013

Observación: Caudal promedio de 0.33 l/s, muestreo conforme a la norma NMX-AA-003-1980  
 NOTA: A/P(Ausencia/Presencia), La declaración de la conformidad se basa en los Límites máximos permisibles de los contaminantes que se encuentran en la NOM-002-SEMARNAT-1996 DESCARGAS DE AGUAS RESIDUALES A LOS SISTEMAS DE ALCANTARILLADO URBANO O MUNICIPAL

**Tabla 7. Resultados de análisis fisicoquímicos del 03 de octubre 2019**

<b>DATOS RECOLECTADOS DE OCTUBRE 2019</b>						
<b>Parámetros analizados</b>	<b>Unidades</b>	<b>Concentración obtenida</b>	<b>Norma</b>	<b>Excedentes</b>	<b>Declaración de la conformidad</b>	<b>Método de Prueba</b>
<b>Demanda Bioquímica de Oxígeno</b>	<b>mg/L</b>	<b>320</b>	<b>150</b>	<b>170</b>	<b>No cumple</b>	<b>NMX-AA-028-SCFI-2001</b>
Materia Flotante	A/P	A	Ausente	--	Cumple	NMX-AA-006-SCFI-2010
Determinación de pH	Unidades	8.9	5.5-10	--	Cumple	NMX-AA-008-SCFI-2016
Media Aritmética de la medición de la temperatura	°C	23	40	--	Cumple	NMX-AA-007-SCFI-2013
<b>Sólidos Suspendidos Totales</b>	<b>mg/L</b>	<b>1055</b>	<b>125</b>	<b>930</b>	<b>No cumple</b>	<b>NMX-AA-034-SCFI-2015</b>
<b>Medición de sólidos sedimentables</b>	<b>mg/L</b>	<b>30</b>	<b>7.5</b>	<b>22.5</b>	<b>No cumple</b>	<b>NMX-AA-004-SCFI-2013</b>
Medición de grasas y aceites Promedio Ponderado	mg/L	< 6	75	--	Cumple	NMX-AA-005-SCFI-2013

Observación: Caudal promedio de 0.27 l/s, muestreo conforme a la norma NMX-AA-003-1980

Nota: A/P(Ausencia/Presencia), La declaración de la conformidad se basa en los Límites máximos permisibles de los contaminantes que se encuentran en la NOM-002-SEMARNAT-1996 DESCARGAS DE AGUAS RESIDUALES A LOS SISTEMAS DE ALCANTARILLADO URBANO O MUNICIPAL.

Los resultados emitidos por la empresa que realizó el análisis fisicoquímico, demuestran que los caudales de agua en el punto de salida, no cumplen con la normatividad correspondiente en los 3 muestreos analizados. Coincidiendo en los mismos parámetros que fueron: **Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO), Sólidos Suspendidos Totales y en un caso la Medición de sólidos sedimentables.**

Estos parámetros según la normatividad mexicana son importantes debido a que establecen los potenciales riesgos que se generan al descargar el agua tratada a la red municipal.

## RESULTADOS DEL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

El resultado de la calidad microbiológica de las aguas residuales se muestra en forma resumida en la tabla 8 que muestra por puntos analizados y por fechas.

En la tabla 9 se muestran los resultados de la determinación del NMP X 100mL de coliformes totales, coliformes fecales, *Escherichia coli*, pH y temperatura con sus repeticiones en los 4 puntos de muestreo de la PTAR de la industria pastelera de la ciudad de Puebla.

**Tabla 8. Número Más Probable x 100 mL de Coliformes totales, coliformes fecales y *Escherichia coli* en muestras de agua residual tratada de empresa Pastelera.**

Punto de muestreo	Fecha	Coliformes totales (NMP/100mL)		Coliformes fecales (NMP/100mL)		Coliformes fecales 1000 NMP/100mL	<i>E. coli</i> (NMP/100mL)		<i>E. coli</i> <2.2 NMP/100mL
		Media	D.E	Media	D.E	Cumple/No Cumple	Media	D.E	Cumple/No Cumple
Entrada	03/06/2019	2400	0	2400	0	<b>Cumple</b>	ND	ND	<b>Cumple</b>
Clarificador	03/06/2019	1533.33	750.55	20.33	20.53				
Biológico	03/06/2019	1966.66	750.55	57.54	36.54				
<b>Salida</b>	<b>03/06/2019</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>				
Entrada	20/06/2019	2400	0	1966.66	750.56	<b>Cumple</b>	2400	0	<b>Cumple</b>
Clarificador	20/06/2019	2400	0	2400	0		2400	0	
Biológico	20/06/2019	1966.66	750.55	138.33	20.21		2400	0	
<b>Salida</b>	<b>20/06/2019</b>	<b>35.43</b>	<b>42.31</b>	<b>0</b>	<b>0</b>		<b>0</b>	<b>0</b>	
Entrada	03/10/2019	1966.66	750.55	127.82	106.54	<b>No cumple</b>	124.48	36.83	<b>No Cumple</b>
Clarificador	03/10/2019	1688.66	1232.06	56.33	94.12		28.94	10.28	
Biológico	03/10/2019	2400	0.00	1966.66	750.56		209.33	217.27	
<b>Salida</b>	<b>03/10/2019</b>	<b>1966.66</b>	<b>750.55</b>	<b>1186.54</b>	<b>1,172.59</b>		<b>24.66</b>	<b>16.50</b>	

Nota: Puntos de muestreo: Entrada, Clarificador, Biológico, Salida. Número Más Probable por cada 100 mL = NMP/mL, *E. coli* <2.2 NMP/mL permitidos para las aguas residuales (descarga o riego) (ADEQ, 2010 and EPA, 2009), el Límite Máximo Permissible de los coliformes fecales es 1000 NMP/100mL (NOM-003-SEMARNAT-1997). D.E.: Desviación Estándar, Media: El promedio de las muestras triplicadas por cada punto de muestreo.

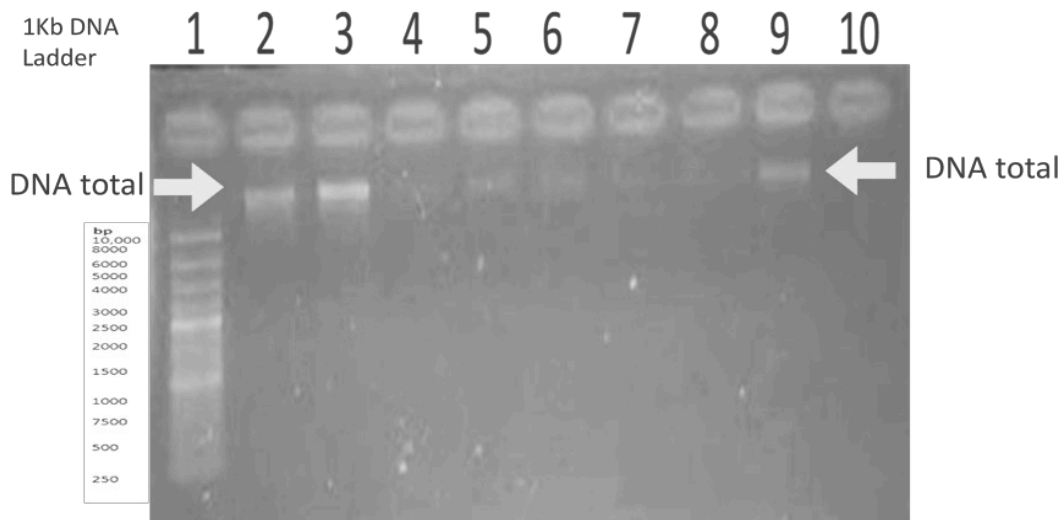
**Tabla 9. NMP X 100mL de Coliformes totales, coliformes fecales y Escherichia coli, pH y temperatura con sus repeticiones en los 4 puntos de muestreo de la PTAR de la industria pastelera de la ciudad de Puebla.**

Fecha	Punto de muestreo	NMP/mL	Coliformes Totales	Coliformes Fecales	E. coli	Réplica A,B,C	pH	Temperatura
06/06/2019	Entrada	NMP/mL	2400	2400		A		
06/06/2019	Entrada	NMP/mL	2400	2400		B	3.88	22
06/06/2019	Entrada	NMP/mL	2400	2400		C		
06/06/2019	Clarificador	NMP/mL	1100	43		A		
06/06/2019	Clarificador	NMP/mL	2400	3		B	8.57	22
06/06/2019	Clarificador	NMP/mL	1100	15		C		
06/06/2019	Biológico	NMP/mL	2400	59.62		A		
06/06/2019	Biológico	NMP/mL	2400	20		B	9.06	22
06/06/2019	Biológico	NMP/mL	1100	93		C		
06/06/2019	Salida	NMP/mL	0	0		A		
06/06/2019	Salida	NMP/mL	0	0		B	8.72	22
06/06/2019	Salida	NMP/mL	0	0		C		
20/06/2019	Entrada	NMP/mL	2400	2400	2400	A		
20/06/2019	Entrada	NMP/mL	2400	2400	2400	B	4	25
20/06/2019	Entrada	NMP/mL	2400	1100	2400	C		
20/06/2019	Clarificador	NMP/mL	2400	2400	2400	A		
20/06/2019	Clarificador	NMP/mL	2400	2400	2400	B	7.83	25
20/06/2019	Clarificador	NMP/mL	2400	2400	2400	C		
20/06/2019	Biológico	NMP/mL	2400	150	2400	A		
20/06/2019	Biológico	NMP/mL	2400	150	2400	B	8	25
20/06/2019	Biológico	NMP/mL	1100	115	2400	C		
20/06/2019	Salida	NMP/mL	3	0	0	A		
20/06/2019	Salida	NMP/mL	20	0	0	B	7.33	25
20/06/2019	Salida	NMP/mL	83.3	0	0	C		
03/10/2019	Entrada	NMP/mL	2400	115	165	A		
03/10/2019	Entrada	NMP/mL	2400	28	93	B	6	24.33
03/10/2019	Entrada	NMP/mL	1100	240	115	C		
03/10/2019	Clarificador	NMP/mL	2400	4	23	A		
03/10/2019	Clarificador	NMP/mL	266	0	41	B	7	24
03/10/2019	Clarificador	NMP/mL	2400	164.99	23	C		
03/10/2019	Biológico	NMP/mL	2400	2400	93	A		
03/10/2019	Biológico	NMP/mL	2400	1100	75	B	7.17	23
03/10/2019	Biológico	NMP/mL	2400	2400	460	C		
03/10/2019	Salida	NMP/MI	2400	1100	20	A		
03/10/2019	Salida	NMP/MI	2400	59.62	11	B	7.17	23
03/10/2019	Salida	NMP/MI	1100	2400	43	C		

## RESULTADOS DE LAS PRUEBAS MOLECULARES PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES PATÓGENAS POR MEDIO DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA.

Para los resultados de las pruebas moleculares para la identificación de especies patógenas, se empezó con la extracción del DNA de las muestras de Entrada, Clarificador, Biológico y Salida. Pero el punto de muestreo de mayor interés es en el punto de Salida, ya que la contaminación de aguas receptoras se origina a partir de la descarga del agua tratada, como es el caso de la industria pastelera. Posteriormente se realizó la PCR de punto final y el corrimiento de electroforesis, para determinar la presencia de microorganismos (DNA Total) de las muestras. Las cuales se consideraron las muestras de junio y octubre de 2019 (Entrada, Clarificador, Biológico y salida) En la siguiente figura se observa el DNA total.

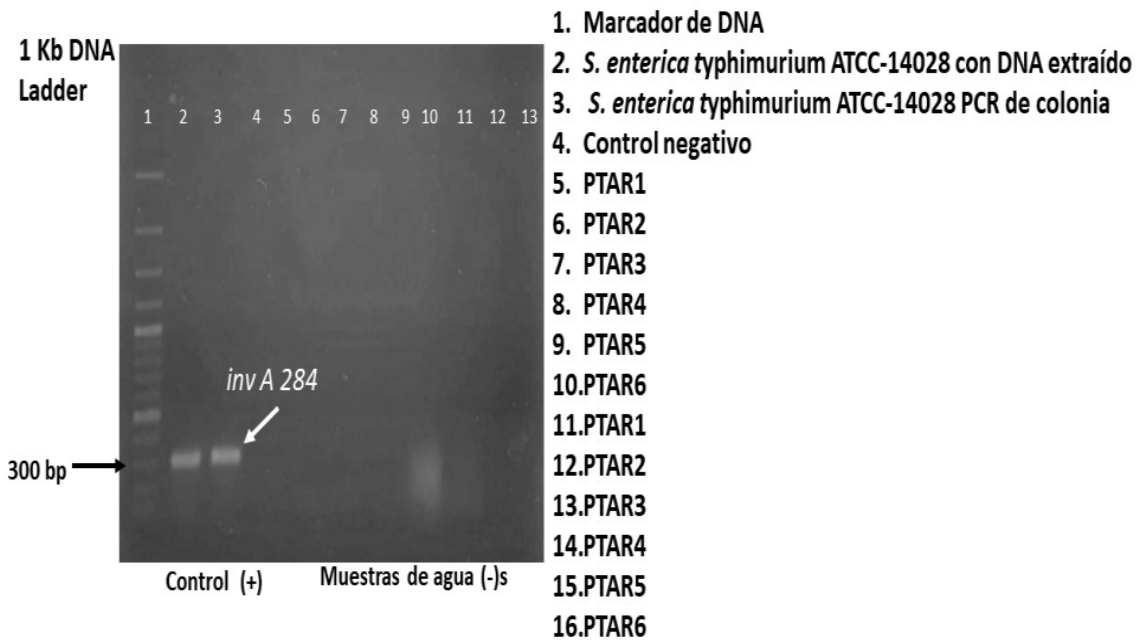
DNA total extraído de bacterias de referencia y colonias sospechosas



**Figura 8. Muestras de DNA total extraído de cepas de referencia (*Salmonella* en línea2, en las líneas 3 y 9 corresponden a cepas obtenidas del agua residual de la empresa en los puntos de entrada, clarificador y salida respectivamente.**

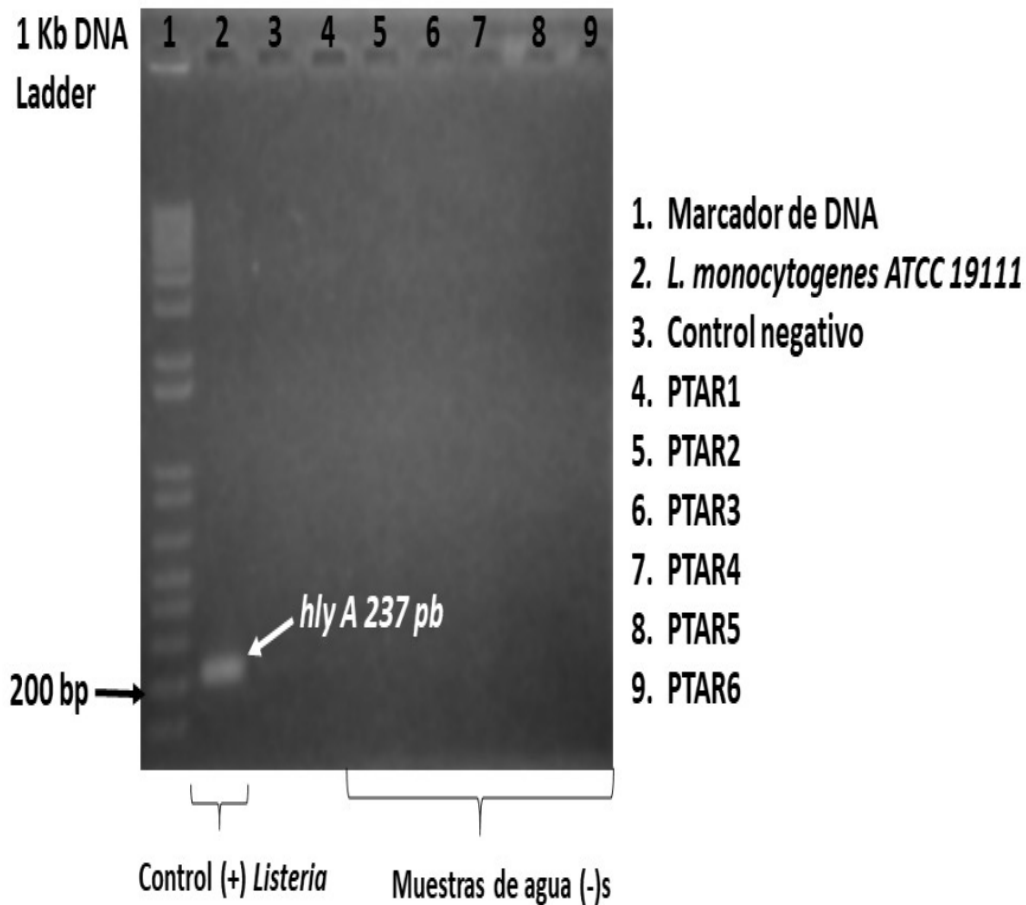
Para descartar la presencia de *Brucella abortus* se realizó la mezcla de reacción para la reacción en cadena de la polimerasa punto final de acuerdo al protocolo de Go Taq Green Master Mix con las condiciones reportadas por López- Goñil *et al.* 2008, para amplificar el par de oligonucleótidos del gen *bp26*. Se utilizó el siguiente rotulado para el programa de la PCR y el corrimiento del gel agarosa: *Brucella abortus* (Control positivo) 1, Entrada (octubre) 2, Biológico (octubre) 3, Salida (octubre) 4 y Salida (junio) 5, Control negativo (agua destilada) 6.

PCR punto final para la búsqueda de *Salmonella sp* en muestras de agua residual tratada y *Salmonella typhimurium* ATCC-14028 como control positivo



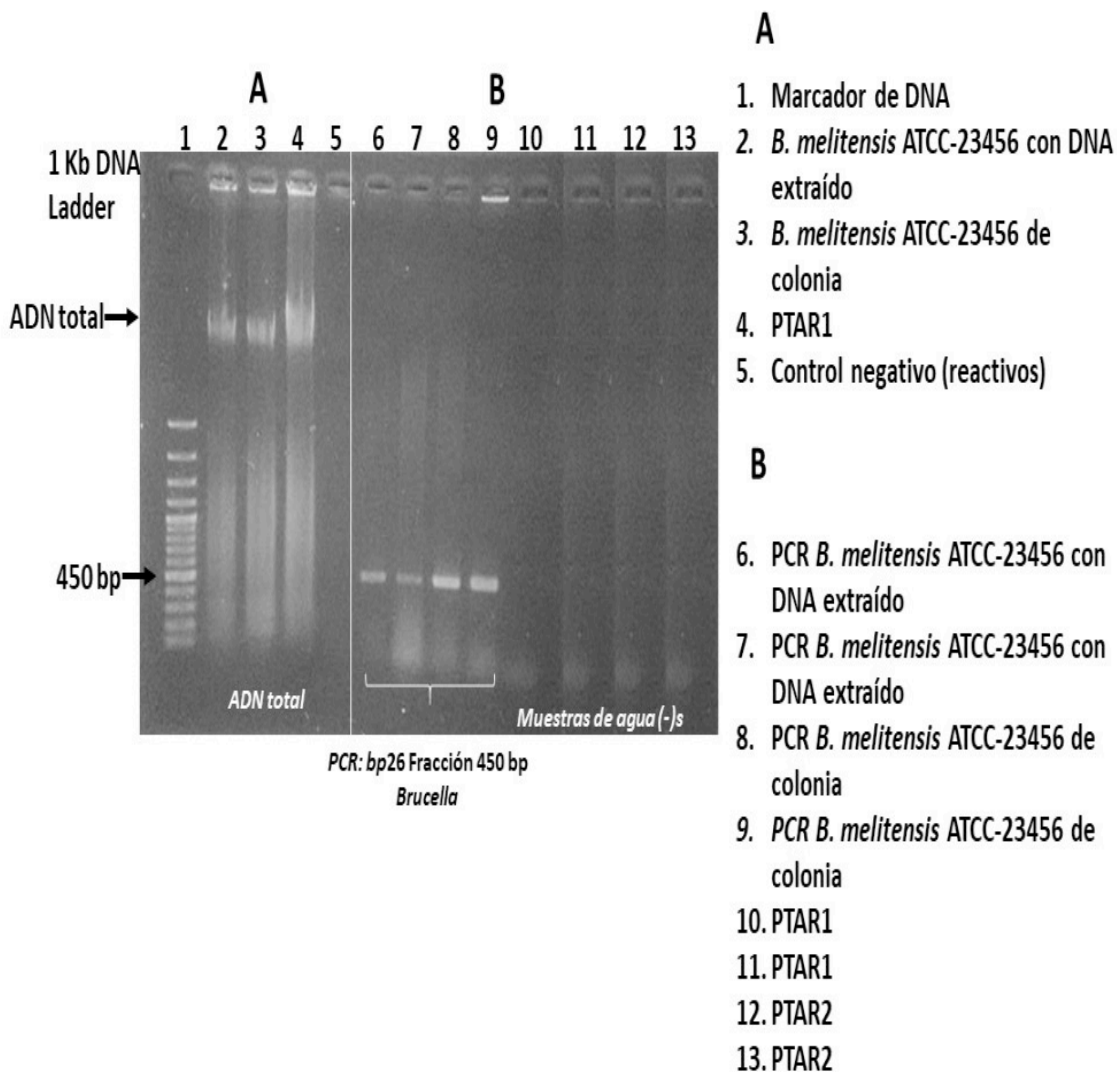
**Figura 9.** Se muestra el amplicón de 284 pb para el gen *inv A* de *S. typhimurium* en las líneas 2 y 3, en la línea 4 se muestra el control negativo y en las demás líneas las diferentes muestras de ADN que se obtuvieron de los diferentes puntos de muestreo de la PTAR, como se observa no se detectó a *Salmonella*.

PCR punto final para la búsqueda de *Listeria sp* en muestras de agua residual tratada y *Listeria monocytogenes* ATCC-19111 como control positivo



**Figura 10. PCR punto final. No hubo amplificación del gen *hly A* de 237 pb de *Listeria monocytogenes* ni para las cepas aisladas del agua tratada de la empresa en los puntos de entrada y salida.**

**ADN total de *Brucella melitensis* M16 y cepas de agua tratada.  
 PCR punto final para la búsqueda de *Brucella sp* en muestras de agua residual tratada y *Brucella melitensis* M16 ATCC-23456 como control positivo**



**Figura 11. PCR punto final. No hubo amplificación del gen bp26 de *Brucella melitensis* ATCC 23456 de 450 pb, ni amplificaron las cepas aisladas del agua tratada de la empresa en los puntos de entrada y salida.**

PCR punto final para la búsqueda de *Shigella* sp en muestras de agua residual tratada y *Shigella flexneri* ATCC 12022 como control positivo

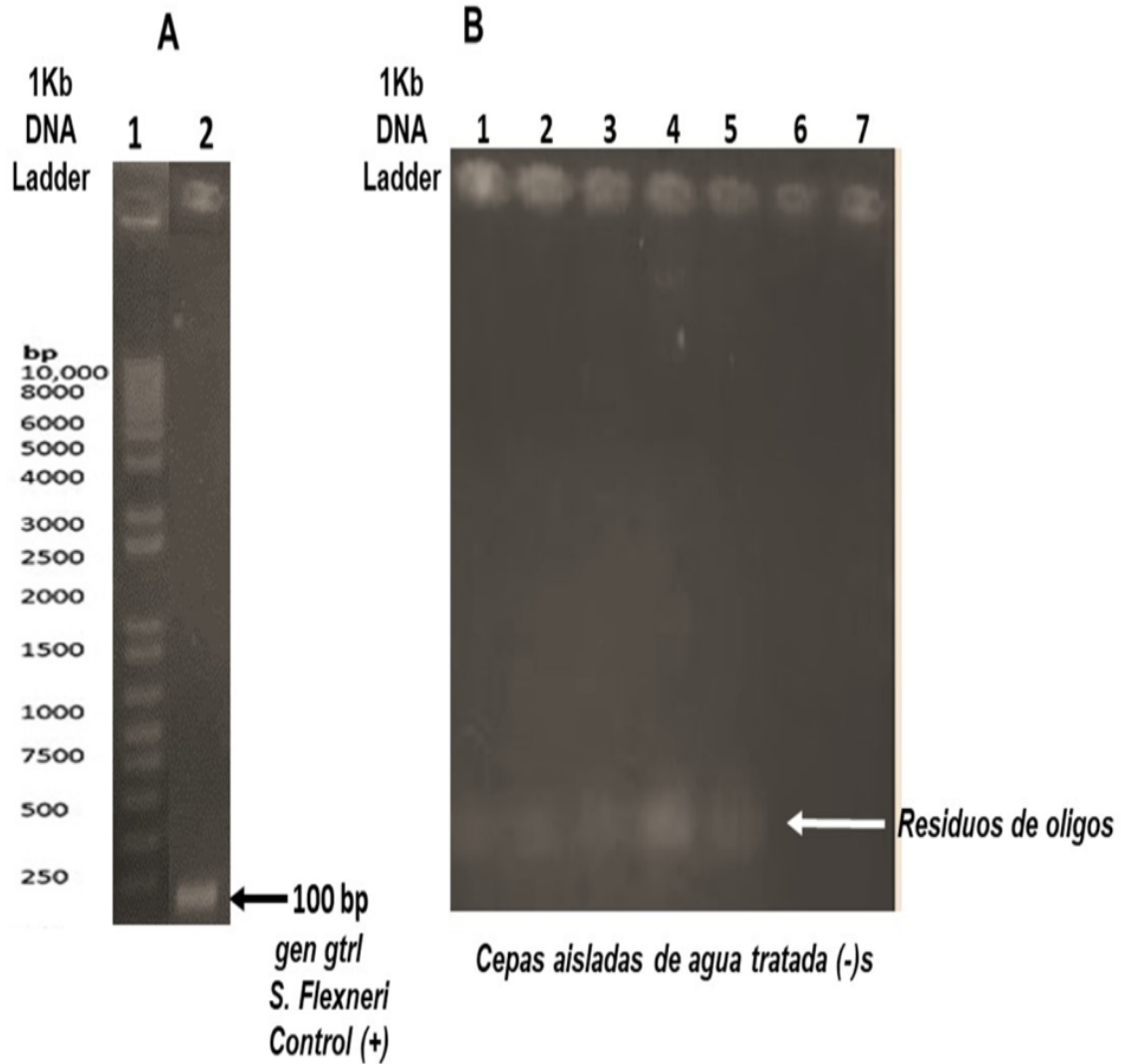


Figura 12. PCR punto final. No hubo amplificación del gen *gtrI* de *Shigella flexneri* 12022 ATCC 12022 ni en los aislados obtenidos del agua tratada de los puntos de entrada y salida.

**Tabla 10. Análisis de las 4 bacterias patógenas en el agua residual a través de la PCR.**

Fecha	Punto de muestreo	Patógeno	Gene blanco	P/A
<b>06/0619</b>	Salida	<i>Listeria monocytogenes</i>	hly A	Ausencia
<b>20/06/2019</b>				
<b>03/10/2019</b>				
<b>06/0619</b>		<i>Salmonella sp.</i>	inv A	Ausencia
<b>20/06/2019</b>				
<b>03/10/2019</b>				
<b>06/0619</b>		<i>Shigella sp</i>	gtrl	Ausencia
<b>20/06/2019</b>				
<b>03/10/2019</b>				
<b>06/0619</b>		<i>Brucella sp</i>	bp26	Ausencia
<b>20/06/2019</b>				
<b>03/10/2019</b>				

Nota: P/A (presencia o ausencia de las 4 bacterias patógenas).

La caracterización de la calidad microbiológica y fisicoquímica del agua residual de las industrias de alimentos ha tenido mayor número de estudios debido a que la reutilización de las aguas en la agricultura, puede ser un riesgo en la transmisión de enfermedades a los consumidores o personas que estén en contacto con los productos generados del reúso del agua.

El agua en la industria alimentaria, además de ser utilizada para el consumo humano, es usada en las etapas de producción y en los drenajes y desagües de la empresa y su calidad se ve afectada por la presencia de microorganismos patógenos, coliformes y otros residuos del proceso que se descargan al drenaje de la red municipal. Las aguas residuales municipales afectan gravemente la calidad de los cuerpos de agua y suelos, debido a que se descargan generalmente sin tratamiento previo (Cervantes-Zepeda, 2011). Aunado a la carga microbiana que se encuentra en las aguas municipales, se suma las descargas de la empresa pastelera que además de microorganismos lleva un aporte de nutrientes (materia

orgánica soluble y suspendida, amonio, nitrógeno orgánico, fosfatos, sulfatos, entre otros), que se derivan de la materia orgánica como proteínas, carbohidratos, y grasas y compuestos químicos de origen antropogénico que contribuyen o participan en la eutroficación de los cuerpos receptores de esas aguas (CONAGUA, 2010). Por lo anterior en este trabajo se valoró la eficiencia del tratamiento fisicoquímico de las aguas residuales y por los resultados obtenidos se observa que este tratamiento no es eficiente debido a que la materia orgánica disuelta y los sólidos suspendidos totales son removidos en valores más altos a lo establecido en la normatividad, como consecuencia esta materia orgánica puede favorecer al crecimiento de los consorcios microbianos que ya están presentes en el efluente o los cuerpos de agua a los que lleguen.

El presente estudio proporciona información sobre la parte terminal de la producción que es la descarga a la red municipal de las aguas residuales del proceso y servicios de la empresa de alimentos. Además, se aporta con la comprobación de que no suman factores de riesgo a la salud humana por estar ausentes bacterias patógenas como *Salmonella*, *Shigella*, *Listeria* y *Brucella*, que son microorganismos causantes de enfermedades infecto contagiosas.

Los coliformes son microorganismos indicadores de la calidad microbiológica en agua tanto potable como residual. Están constituidos por los géneros *Klebsiella* spp, *Escherichia* spp, *Citrobacter* spp y *Enterobacter* spp, y aunque están asociados con las heces, *Escherichia coli* es el indicador microbiológico de contaminación fecal, originaria del hombre porque además de formar parte de la microbiota normal del intestino también podría ser un patógeno gastrointestinal.

El tratamiento primario industrial está diseñado para precipitar y sedimentar los sólidos y neutralizar el efluente industrial antes de ser tratado municipalmente. La planta de tratamiento de aguas residuales de la industria pastelera realiza el tratamiento primario y es una planta de un caudal bajo (43.2 m<sup>3</sup>/día) que funciona una vez a la semana o que realiza un tratamiento por lotes. Por esa característica es probable que la composición y parámetros fisicoquímicos no sean homogéneos en todos los muestreos, aunado a que la toma de muestra se realizó solo en fechas programadas en las que la empresa autorizó realizarlas. Los análisis fisicoquímicos

del agua residual fueron realizados por una empresa externa a la industria pastelera y se nos proporcionó la información. Con estos datos se realizó un análisis de la eficiencia del tratamiento primario. Y se pudo observar que el indicador  $DBO_5$ , NO cumplió en tres de cuatro muestreos con los límites establecidos en NORMA Oficial Mexicana NOM-001-ECOL-1996, Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales.. Así como también en la medición de sólidos sedimentables en los que rebasó desde 1.5 hasta 930 mg/L.

El análisis de los exámenes fisicoquímicos se realizó con base en siete determinaciones que fueron:  $DBO_5$ , materia flotante (4 determinaciones), determinación de pH (4 mediciones), temperatura (media aritmética de temperatura), sólidos suspendidos totales, medición de sólidos sedimentables, medición de grasas y aceites (promedio ponderado), estas determinaciones son las que establecen las diversas normas mexicanas (NMX-AA de SCFI en diferentes años). De los parámetros analizados, la Demanda Bioquímica de Oxígeno ( $DBO_5$ ) tiene una gran importancia porque permite conocer la capacidad de contaminación de los cuerpos receptores, y la concentración de contaminante de las aguas negras y los desechos industriales. La DBO se produce normalmente en el agua, por la materia orgánica disuelta y coloidal. La prueba mide el oxígeno utilizado durante el periodo de incubación especificado, para la degradación bioquímica de la materia orgánica, y el oxígeno utilizado para oxidar materia orgánica como los sulfuros y el ion ferroso.

Los factores más importantes que afectan el crecimiento biológico son la temperatura, la disponibilidad de nutrientes, el suministro de oxígeno, el pH y la presencia de tóxicos. El incremento de la temperatura acelera los procesos bacteriológicos y la tasa de utilización de oxígeno, es decir, la tasa de velocidad de la reacción biológica, está en función de la temperatura. La temperatura estándar para la determinación de DBO es de 20°C. El pH debe de ajustarse en el agua residual al rango de 6.5 a 7.5 para obtener valores confiables de la DBO. Ya que los microorganismos se desarrollan o sobreviven mejor en condiciones de pH neutro.

Con las consideraciones que se han mencionado en los resultados obtenidos en este trabajo se observó que en todos los muestreos de  $\text{DBO}_5$  el tratamiento fisicoquímico no fue adecuado por no cumplir la normativa mexicana. Estos valores se relacionan con los valores de pH, los que no se lograron ajustar a pH entre 6.5 y 7.5, ya que en todos los muestreos oscilaron entre 9.4, 8.9, 8.3, 7.8. Esto en relación con los análisis de los parámetros fisicoquímicos realizados por la empresa externa. Los valores de pH y temperatura se tomaron de manera simultánea en el muestreo de los diversos puntos del proceso y esos valores difieren con respecto a los realizados por la empresa. En nuestros resultados los valores pH en el punto de entrada a la PTAR fueron ácidos (3.88, 4 y 6) mientras que en la salida fueron 8.72, 7.33 y 7.16, relacionándose más a lo requerido para la obtención de valores adecuados de  $\text{DBO}_5$ . Con respecto a la temperatura las determinadas por el análisis externo estuvieron en promedio de 22, 23, 24, y 27°C, o que nos indica que puede haber aceleración del proceso bacteriológico. En los datos que registramos en los muestreos la temperatura estuvo a 22 y 25 °C, lo que coincidió con los análisis externos.

Las aguas residuales contienen sólidos no sedimentables: suspendidos, coloidales y disueltos. Los sólidos suspendidos son transportados por arrastre y soporte del movimiento del agua; los más pequeños (menos de 0.01 mm) no sedimentan rápidamente y se consideran sólidos no sedimentables, y los más grandes (mayores de 0.01 mm) son generalmente sedimentables. Los sólidos coloidales consisten en limo fino, bacterias, partículas causantes de color, virus, etc., los cuales no sedimentan sino después de periodos razonables, y su efecto global se traduce en el color y la turbiedad de aguas sedimentadas sin coagulación. Los sólidos disueltos, materia orgánica e inorgánica, son invisibles por separado, no son sedimentables y globalmente causan diferentes problemas de olor, sabor, color y salud, a menos que sean precipitados y removidos mediante métodos físicos y químicos. Los sólidos deben eliminarse para que no se agudice la disminución del paso de la energía solar, aumento del color, variación de la solubilidad del oxígeno, depósitos sobre el fondo del efluente receptor favoreciendo la aparición de condiciones anaerobias.

En este estudio, tanto los sólidos sedimentables (SS) como los no sedimentables (SST) incumplieron en uno o más muestreos. Este factor afecta debido a que el agua residual tratada lleva materia orgánica en cantidades elevadas y al juntarse con efluentes de la red municipal, podrá ser utilizada por los microorganismos aumentando los procesos de eutrofización.

Con respecto a la calidad microbiológica del agua, en la tabla 10 que resume los tres muestreos realizados, se observa que, en el tercer y último análisis, el agua de salida lleva tanto una elevada carga microbiana que rebasa la normatividad como excedentes de DBO<sub>5</sub> y SST elevados, demostrando la mala calidad y la ineficiencia del tratamiento primario de la PTAR de la empresa pastelera.

A diferencia de este estudio en el cual no se logró detectar a *Salmonella*, ni *Shigella* en el agua tratada de la PTAR, en otras investigaciones realizadas por Fu y colaboradores en el 2015 comprobaron que *Salmonella* sp y *Shigella* sp se encontraron en los biosólidos resultantes pos tratamiento de las aguas residuales y su reactivación se dio durante el almacenamiento de la pasta, alcanzando hasta cuatro veces más su población en comparación a las encontradas en las aguas en tratamiento. Lo anterior sugiere que las bacterias desarrollan una estrategia de sobrevivencia en respuesta al estrés ambiental que sufren por la variación de los factores como la temperatura, carencia de nutrientes, concentración de metales pesados, concentración de oxígeno, cloro y otros compuestos químicos tóxicos que pueden inducir a las bacterias a estresarse (Fu, Jiang, & Liu, 2015).

Los coliformes fecales son microorganismos termotolerantes, ya que pueden soportar temperaturas más elevadas, este subgrupo se diferencia de los coliformes totales por esta característica. La capacidad de reproducción de los coliformes fecales fuera del intestino de los animales es favorecida por las condiciones adecuadas de materia orgánica, pH, humedad, etc. Estas bacterias son importantes en el área médica, ya que pueden inducir infecciones oportunistas en el tracto respiratorio superior e inferior, además de bacteriemia, infecciones de piel y tejidos blandos, enfermedad diarreica aguda entre otras enfermedades (Arcos y col, 2005).

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

## Análisis estadístico por modelo lineal y Prueba de Tukey.

Antes de realizar el análisis estadístico se establece el nivel de significancia  $\alpha$  del 5% (0.05), así como las hipótesis estadísticas

1) Todos los tratamientos producen el mismo efecto.

$H_0: \mu A(\text{entrada}) = \mu B(\text{clarificador}) = \mu C(\text{biológico}) = \mu D(\text{salida})$

2) Frente a la alternativa: al menos algún tratamiento produce efecto en el número de coliformes totales.

$H_a: \mu A(\text{entrada}) \neq \mu B(\text{clarificador}) \neq \mu C(\text{biológico}) \neq \mu D(\text{salida})$

```
Call:
lm(formula = Col.Totales ~ Tratamiento, data = ColiformesT)

Residuals:
    Min       1Q   Median       3Q      Max
-1608.0  -665.1   144.4   324.8  1732.6

Coefficients:
              Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
(Intercept)    2255.6     252.1    8.947 3.21e-10 ***
Tratamiento[T.B] -381.6     356.5   -1.070   0.293
Tratamiento[T.C] -144.4     356.5   -0.405   0.688
Tratamiento[T.D] -1588.2     356.5   -4.455 9.62e-05 ***
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 756.3 on 32 degrees of freedom
Multiple R-squared:  0.4359, Adjusted R-squared:  0.383
F-statistic: 8.241 on 3 and 32 DF, p-value: 0.0003327
```

Esta es la salida para el modelo lineal, en la cual de acuerdo al valor de  $P$  se puede hablar de una influencia del tratamiento en la variable respuesta (coliformes totales). Lo anterior si consideramos las hipótesis estadísticas, cuyo contraste con el valor de  $P$  nos permite rechazar  $H_0$  (igualdad de medias) aceptando que los tratamientos tuvieron efecto en la variable respuesta (coliformes totales).

Posteriormente se puede realizar un post hoc, como la prueba Tukey de comparación múltiple para encontrar entre qué grupos o tratamientos se encuentran las diferencias más significativas.

En la imagen se observa la comparación múltiple de medias. Lo que se hizo fue establecer hipótesis estadísticas para cada uno de los tratamientos, por ejemplo: establecer en la  $H_0$  que la media de coliformes totales de biológico es igual a la media de coliformes totales de salida, contra la  $H_a$  de la diferencia de medias para el número de coliformes totales de biológico y salida.

$$H_0 : \mu_{C(\text{biológico})} = \mu_{D(\text{salida})}$$

$$H_a : \mu_{C(\text{biológico})} \neq \mu_{D(\text{salida})}$$

```

Simultaneous Tests for General Linear Hypotheses

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

Fit: aov(formula = Col.Totales ~ Tratamiento, data = ColiformesT)

Linear Hypotheses:
      Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
B - A == 0    -381.6     356.5  -1.070  0.70981
C - A == 0    -144.4     356.5  -0.405  0.97714
D - A == 0   -1588.2     356.5  -4.455 < 0.001 ***
C - B == 0     237.1     356.5   0.665  0.90940
D - B == 0   -1206.6     356.5  -3.384  0.00992 **
D - C == 0   -1443.7     356.5  -4.049  0.00179 **
---

```

El valor de  $P$ , para la comparación de estas medias, es de 0.00179, resultando menor al valor de alfa establecido de 0.05 (5%), aceptando la diferencia de medias que indica un efecto del tratamiento sobre la variable respuesta (número de coliformes).

De lo anterior se puede concluir con un párrafo, no es necesario incluir toda la explicación antes mencionada:

El análisis estadístico mediante modelo lineal evidencia la influencia del tipo de tratamiento en el número de coliformes totales ( $P < 0.05$ ). De igual forma, el test Tukey revela la eficiencia en el tratamiento final, siendo detectadas diferencias significativas en todos los puntos de muestreo correspondientes a los diversos

tratamientos respecto a las muestras obtenidas a la salida del tratamiento final ( $P < 0.05$ ).

*Nota: este análisis es solo para la variable de coliformes totales, el mismo procedimiento se debe realizar para las otras variables evaluadas (coliformes fecales, pH, temperatura y E-coli).*

Analizando la significancia de la fecha en la que se realizó el muestreo como importante, entonces se hizo un ANOVA de 2 factores: factor 1 que corresponde a los tratamientos (entrada, clarificador, biológico y salida) y factor 2, fecha (06/06/2019, 20/06/2019 y 03/10/2019). Obteniendo los siguientes resultados:

De igual forma se establece un  $\alpha$  de 0.05, teniendo las siguientes hipótesis:

Para el caso de Fecha:

1) El día del muestreo no tiene efecto sobre el número de coliformes totales.

$$H_0 : \mu_{A(\text{entrada})} = \mu_{B(\text{clarificador})} = \mu_{C(\text{biológico})} = \mu_{D(\text{salida})}$$

2) Frente a la alternativa: Al menos algún día influye en el número de coliformes totales.

$$H_a : \mu_{A(\text{entrada})} \neq \mu_{B(\text{clarificador})} \neq \mu_{C(\text{biológico})} \neq \mu_{D(\text{salida})}$$

Para el caso del tratamiento

1) Todos los tratamientos producen el mismo efecto en el número de coliformes totales

$$H_0 : \mu_{A(\text{entrada})} = \mu_{B(\text{clarificador})} = \mu_{C(\text{biológico})} = \mu_{D(\text{salida})}$$

2) Frente a la alternativa: al menos algún tratamiento produce efecto en el número de coliformes totales.

$$H_a : \mu_{A(\text{entrada})} \neq \mu_{B(\text{clarificador})} \neq \mu_{C(\text{biológico})} \neq \mu_{D(\text{salida})}$$

Al realizar el análisis se obtiene los siguientes resultados:

```

> Anova (AnovaModel.2)
Anova Table (Type II tests)

Response: Col.Totales

          Sum Sq Df F value    Pr(>F)
Fecha      1701206  2  2.3538    0.11656
Tratamiento 14142097  3 13.0449 0.00002956 ***
Fecha:Tratamiento 7929835  6  3.6573    0.01013 *
Residuals      8672885 24
---

```

Con el valor de  $P$  calculado para el factor fecha el contraste resulta no significativo ( $P > 0.05$ ; con ello se acepta la  $H_0$  que establece la igualdad de medias y, por tanto, la ausencia de cambios), demostrado que no existe evidencia estadística que permita destacar al día del muestreo como un factor influyente en la concentración de coliformes totales.

```

> Anova (AnovaModel.2)
Anova Table (Type II tests)

Response: Col.Totales

          Sum Sq Df F value    Pr(>F)
Fecha      1701206  2  2.3538    0.11656
Tratamiento 14142097  3 13.0449 0.00002956 ***
Fecha:Tratamiento 7929835  6  3.6573    0.01013 *
Residuals      8672885 24
---

```

Para el caso del factor tratamiento, el contraste resulta significativo ( $P < 0.05$ ) aceptando la  $H_a$  de la diferencia de medias, por lo que se puede establecer que el tipo de tratamiento (entrada, clarificador, biológico y salida) influye en los cambios de concentración de coliformes totales

De igual forma, este análisis permite clarificar si el efecto de un factor depende del nivel del otro factor mediante la interacción de ambos

```

> Anova (AnovaModel.2)
Anova Table (Type II tests)

Response: Col.Totales

      Sum Sq Df F value    Pr(>F)
Fecha    1701206  2  2.3538  0.11656
Tratamiento 14142097  3 13.0449 0.00002956 ***
Fecha:Tratamiento 7929835  6  3.6573  0.01013 *
Residuals    8672885 24
---


```

Para este caso se observa que la interacción de la fecha con el tratamiento resulta ser significativo ( $P < 0.05$ ), pudiendo ser una interacción negativa o positiva (cuando el efecto de los factores actuando juntos es mayor que la suma de efectos actuando por separado)

En cuanto a la Responsabilidad Social de la empresa pastelera estudiada, fue un compromiso voluntario, el hecho ha sido que desde que se implementa la planta de tratamiento de aguas residuales hasta la búsqueda de microorganismos patógenos y descargar agua residual tratada al alcantarillado municipal, hace que se sigan las políticas para alcanzar el Distintivo ESR, por lo que este trabajo contribuyó en el principio de “llevar a cabo iniciativas para promover mayor responsabilidad ambiental”.

De los diez principios que propone el pacto global, la empresa pastelera abordó en colaboración con este proyecto solo los 7,8 y 9 referentes al Medio Ambiente, a diferencia de otros estudios en los que enfocan sus esfuerzos para alcanzar el distintivo ESR mejorando la relación con los clientes, proveedores y trabajadores. Barroso Tanoira, 2008.

## 8. CONCLUSIONES

-  El agua residual tratada en la PTAR de la empresa pastelera, en el punto de salida hacia la red municipal, NO cumple con st indicadores BBO<sub>5</sub> y sólidos suspendidos totales, ya que estos son elevados en todos los casos.

- ✚ El tratamiento fisicoquímico primario que se realiza en la PTAR de la industria pastelera, No fue suficiente para cumplir con la normatividad mexicana. Por lo que, al salir el agua a la red municipal, lleva materia orgánica útil como nutriente para las cantidades que lleva de bacterias de ese efluente y a los que llegue.
- ✚ A pesar de que la PTAR no cumplió con algunos parámetros que solicita la normatividad, no se encontraron bacterias patógenas de los géneros *Salmonella*, *Listeria*, *Shigella* o *Brucella*.
- ✚ La responsabilidad social de la empresa hace referencia a la ausencia de bacterias patógenas en el punto de salida hacia el drenaje municipal.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Ávila Peltroche, J. G. J. (2015). Evaluación de la remoción de nitratos y fosfatos a nivel laboratorio por microalgas libres e inmovilizadas para el Tratamiento Terciario de Aguas Residuales Municipales.
- Báez-Moreno G. K. y Avelino-Flores F. (2018). *Incidencia de Listeria monocytogenes en quesos frescos no pasteurizados provenientes de diferentes mercados de la ciudad de Puebla, determinada mediante PCR* (tesis de Licenciatura). Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México.
- Brengi, S., Quangzheng, S., Bolaños, H., Duarte, F., Jenkins, C., Pichel, M., . . . Xu, J. (30 de Enero de 2019). PCR-based method for *S. flexneri* serotyping: International Multicenter Validation. *Journal of Clinical Microbiology*, 1-21. doi:10.1128/JCM.01592-18
- Caicedo, C., Rosenwinkel, K., Exner, M., Verstrate, W., Suchenwirth, R., & Hartemann, P. &. (27 de Octubre de 2018). Legionella occurrence in municipal and industrial wastewater treatment plants and risks of reclaimed wastewater reuse: , 149, pp. 21-34. *Review. Water Research*(149), 21-34. doi:https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.10.080.
- Cajiga Calderón, J. F. (2005). *El concepto de responsabilidad social empresarial*. Centro Mexicano para la Filantropía. Recuperado el 27 de Marzo de 2019, de [https://www.cemefi.org/esr/images/stories/pdf/esr/concepto\\_esr.pdf](https://www.cemefi.org/esr/images/stories/pdf/esr/concepto_esr.pdf)
- Conagua, S. (2011, 2012). *Situación del Subsector Agua Potable, Alcantarillado y Saneamiento. Ediciones 2011 y 2012*. México.
- Conagua, S. (2013). *Situación del Subsector Agua Potable, Alcantarillado y Saneamiento. Edición 2013*. México.
- Conagua, S. (2018). *Estadísticas del Agua en México 2018*. México. Obtenido de [http://sina.conagua.gob.mx/publicaciones/EAM\\_2018.pdf](http://sina.conagua.gob.mx/publicaciones/EAM_2018.pdf)

- Fitzhenry, K., Rowan, N., Finnegan, W., & Zhan, X. &. (2018). Microbiological characterisation and impact of suspended solids on pathogen removal from wastewaters in dairy processing factories. *Journal of Dairy Research.*, 85, 391–395. doi:doi:10.1017/S0022029918000602
- Fu, B., Jiang, Q., & Liu, H.-B. &. (24 de Mayo de 2015). Quantification of viable but nonculturable salmonella spp. and Shigella spp. during sludge anaerobic digestion and their reactivation during cake storage. *Journal of Applied Microbiology*, 1138-1147.
- González, M. &. (2011). Uso seguro y riesgos microbiológicos del agua para agricultura. *Revista Cubana de Salud Pública*, 1-11.
- Halter, E., & Steffen, S. &. (28 de Julio de 2016). Permanent colonization of creek sediments, creek water and limnic water plants by four *Listeria* species in low population densities. . *Zeitschrift für Naturforschung C*( 71), 335-345. doi:DOI 10.1515/znc-2016-0114
- Healy-Profitos, J., Lee, S., Mouhaman, A., Garabed, R., Moritz, M., & Piperata, B. &. (2016). Neighborhood diversity of potentially pathogenic bacteria in drinking wáter from the city of Maroua, Cameroon. *J. Water Health*(14), 559–570.
- Hernández Domínguez, C., Hernández Anguiano, A. M., C., C. Q., & Rendón Sánchez, G. &. (2008). Detección de Salmonella y coliformes fecales en agua de uso agrícola para la producción de melón “Cantaloupe”. *Agricultura Técnica en México*, 34 (1), 75-84.
- Hyun- Joong, K., Ji-Oh, R., & Ji- Yeon, S. &.-Y. (2017). Multiplex Polymerase Chain Reaction for Identification of Shigellae and Four Shigella Species Using Novel Genetic Markers Screened by Comparative Genomics. *FOODBORNE PATHOGENS AND DISEASE*, 20(20), 1-7. doi:10.1089/fpd.2016.2221
- Kiely, G. (1999). *Ingeniería Ambiental (fundamentos, entornos, tecnologías y sistemas de gestión)*. España: Mc Graw Hill.
- Klase, G., Lee, S., Liang, S., Jinnam, K., & Young, G. &. (21 de Agosto de 2018). The microbiome and antibiotic resistance in integrated fishfarm water: Implications of environmental public health. *Science of the total environmental*(649), 1491-1501.
- Lee, J., Gu, S., Min, H., & Beom, Y. &. (01 de Febrero de 2017). Characterization of antibiotic resistance genes in representative organic soil wastes: Food waste- recycling wastewater, manure, and sewage sludge. . *Science of the total environmental*.(579), 1692-1698. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.11.187
- Lopez-Goñi, I., D., G.-Y., M., M. C., de Miguel, M. J., M., M. P., M., B. J., . . . Albert, D. &.-B. (2008). Evaluation of a Multiplex PCR Assay (Bruce-ladder) for Molecular Typing of All *Brucella* Species, Including the Vaccine Strains. *J. CLIN. MICROBIOL*, 46(10), 3484–3487. doi:doi:10.1128/JCM.00837-08.
- Mhongole, O., Mdegela, R., Kusiluka, L., & Forslund, A. &. (03 de Febrero de 2017). Characterization of Salmonella spp. from wastewater used for food production in Morogoro, Tanzania. *World J Microbiol Biotechnol*(33), 1-7.

- OEFA, O. d. (2014). *FISCALIZACIÓN AMBIENTAL EN AGUAS RESIDUALES*. Equipo de la Subdirección de Supervisión a Entidades de la, Lima. Recuperado el 21 de Abril de 2020, de [https://www.oefa.gob.pe/?wpfb\\_dl=7827](https://www.oefa.gob.pe/?wpfb_dl=7827)
- Raskin, L., Zheng, D., Griffin, M., & Stroot, P. &. (1995). Characterization of microbial communities in anaerobic bioreactors using molecular probes. *Journal of microbiology*( 68), 297- 308.
- Soni, D., Singh, R., & Singh, D. &. (28 de Noviembre de 2012). Characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from Ganges water, human clinical and milk samples at Varanasi, India. *Infection, Genetics and Evolution*(14), 83-91.
- Stošić, M., Čučak, D., Kovačević, S., Perovic, M., Radonic, J., Sekulić, M., & Miloradoc, M. &. (2016). Meat industry wastewater: microbiological quality and antimicrobial susceptibility of *E. coli* and *Salmonella* sp. isolates, case study in Vojvodina, Serbia. *Water Science & Technology*(73), 2509-2517.
- Torres, P., Madera-Parra, C. A., & Silva-Leal, J. A. (2013). Mejoramiento de la calidad microbiológica de biosólidos generados en plantas de tratamiento de aguas residuales domésticas. *Revista EIA*.)
- Van Der Ploeg, C., Rogé, A., Bordagorría, X., De Urquiza, M., & Castillo, A. &. (Enero de 2018). Design of Two Multiplex PCR Assays for Serotyping *Shigella flexneri*. *Foodborne Pathogens And Disease*(15), 3.
- Villalobos, E., & Torres, A. (Abril de 1998). PCR for Detection of *Shigella* spp. in Mayonnaise. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 64(4), 1242-1945.
- Yassi, A., Kjellström, T., & de Kok, T. (2002). *SALUD AMBIENTAL BÁSICA*. Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente, Oficina Regional para América Latina y el Caribe, México D.F. Recuperado el 21 de Abril de 2020, de [http://www.pnuma.org/educamb/documentos/salud\\_ambiental\\_basica.pdf](http://www.pnuma.org/educamb/documentos/salud_ambiental_basica.pdf)
- Rivas, W. A. L. (2011). Uso del extracto de fique (*Furcraea* sp.) como coadyuvante de coagulación en tratamiento de efluentes de pastelería. *Producción+ Limpia*,6(1), 21-34.
- Rojas, R. (2002). Sistemas de tratamiento de aguas residuales. *Gestión integral de tratamiento de aguas residuales*, 1(1), 8-15.
- Chen, J. P., Yang, L., Bai, R., & Hung, Y. T. (2006). Bakery Waste Treatment. *Waste Treatment in the Food Processing Industry*.
- Macías, J. G. L., & Guadalajara, J. (2013). Los Lodos de las Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales, ¿Problema o Recurso? *Jalisco, Guadalajara, México*. Obtenido de *Ingeniería Química, Guda: http://www.ai.org.mx/ai/images/sitio/201309/ingresos/jglm/doc\_ingreso\_gualberto\_limon\_trabajo\_de\_ingreso.pdf*.García, A. L. I. N. A. (2007).
- Responsabilidad social empresarial. Su contribución al desarrollo sostenible. *Revista futuros*,5, 17.

Organización de las Naciones Unidas. (2015). Agenda 2030 de Desarrollo Sostenible. Nueva York, Estados Unidos: Asamblea General de las Naciones Unidas.

Santos, J. J. G., & Gómez, S. M. M. (2016). La evolución del concepto de Responsabilidad Social Corporativa: Revisión literaria. *Conciencia Tecnológica*, (51), 38-46.

Barroso Tanoira, F. G. (2008). La responsabilidad social empresarial: un estudio en cuarenta empresas de la ciudad de Mérida, Yucatán. *Contaduría y administración*, (226), 73-91.