



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



INSTITUTO DE CIENCIAS

POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES

“La Tierra no es de nosotros, nosotros somos de la Tierra”

Aplicación de *Chlorella vulgaris* en agua residual para su reuso

Tesis

Que para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS AMBIENTALES

Presenta:

CELESTE SOLÍS MARTÍNEZ

Director de tesis:

Dr. Fernando Hernandez Aldana

Codirector de Tesis:

Dr. Ernesto Mangas Ramírez

septiembre 2018



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



INSTITUTO DE CIENCIAS

POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES

"La Tierra no es de nosotros, nosotros somos de la Tierra"

Aplicación de *Chlorella vulgaris* en agua residual para su reuso

Tesis

Que para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS AMBIENTALES

Presenta:

CELESTE SOLÍS MARTÍNEZ

Comité tutorial:

M.C. Dolores Castañeda Antonio
Dr. José Víctor Rosendo Tamariz Flores
Dr. José Antonio Rivera Tapia
Dr. Manuel Huerta Lara
Dra. María Lilia Cedillo Ramírez

Septiembre 2018

Contenido

Lista de Figuras	6
Lista de Imágenes	7
Lista de Tablas	8
Resumen	9
Abstract	9
I. INTRODUCCIÓN	10
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	12
III. JUSTIFICACIÓN	13
IV. HIPÓTESIS	14
V. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	15
VI. OBJETIVOS	15
Objetivo general	15
Objetivos específicos	15
VII. MARCO TEÓRICO	16
7.1 Distribución del agua	16
7.2 Tipos de contaminación de agua	17
7.3 Contaminación a nivel mundial	19
7.4 Contaminación del agua en México	19
7.5 Contaminación de agua en Puebla	20
7.6 Tratamiento de aguas residuales	22
7.6.1 Pretratamiento	22
7.6.2 Tratamiento Primario	22
7.6.3 Tratamiento Secundario	23
7.6.4 Tratamiento terciario	23
7.6.5 Biorremediación	23
7.6.6 Tecnologías fotoquímicas	23
7.7 Sistema UV/H ₂ O ₂	24
7.8 Uso de aguas residuales	25
7.9 Uso de <i>Chlorella vulgaris</i> en biorremediación	26

7.10 Marco legal.....	26
7.11 Relación Sociedad-Medio ambiente	27
VIII. MATERIALES Y MÉTODOS	29
8.1 Muestras.....	29
8.2 Fase de laboratorio	31
8.3 Caracterización del agua residual antes y después de tratamiento	33
8.4 Ensayos microbiológicos	34
8.4.1 Preparación del caldo nutritivo.....	34
8.4.2 Preparación de agar MacConkey	34
8.4.3 Método de diluciones decimales	34
8.4.4 Identificación con Compact Dry	35
8.4.5 Cuantificación de metales por Espectroscopia de absorción atómica	36
8.5 Bioensayo con agua residual pre-tratada	37
8.5.1 Pruebas con <i>C. vulgaris</i>	37
8.5.2 <i>Conteo celular</i>	38
8.5.3 Preparación de la muestra:	39
8.5.4 Introducción de la muestra en la cámara de Neubauer:	39
8.5.5 Preparación y enfoque del microscopio.	39
8.5.6 Cálculo de la concentración	40
8.6 Fotodegradación	40
8.7 Cromatografía de gases	41
8.7.1 Extracción liquido-liquido.....	41
8.7.2 Análisis con Cromatografía de gases acoplada a masas	42
8.8 Análisis de toxicidad	42
8.8.1 <i>Allium sativum</i>	43
8.8.2 <i>Daphnia magna</i>	44
Análisis estadístico	45
IX RESULTADOS Y DISCUSION.....	45
9.1 Fotodegradación	49
9.2 Caracterización	50

9.3 Biomasa	53
9.4 Análisis microbiológico del efluente residual	53
9.4 Análisis microbiológico posterior a tratamiento fotoquímico	59
9.5 Cromatografía de Gases	62
9.6 Toxicidad	70
9.6.1 <i>Daphnia magna</i>	70
9.6.2 <i>Allium sativum</i>	70
9.7 Aberraciones presentes	78
X Conclusiones.....	80
XI Bibliografía.....	81

Lista de Figuras

Figura 1. Usos comunes de microalgas [8].....	11
Figura 2. Distribución del agua a nivel mundial [23], adaptada por Solís 2018.....	17
Figura 3. Agua residual en México, Fuente: CENTRO VIRTUAL DE INFORMACION DEL AGUA	20
Figura 4. Integraciones que existen en el tratamiento de aguas.....	28
Figura 5 Esquema de planta de tratamiento	29
Figura 6. Fase de campo, toma de muestra en PTAR, Fuente: Solís, 2018.....	31
Figura 7. Esquema de las metodologías utilizadas para la realización de este trabajo, Fuente: Solís, 2018.....	32
Figura 8. Diluciones decimales, Fuente: Solís, 2018	35
Figura 9. Bioensayo con <i>C. vulgaris</i> en disoluciones de ERPT, Fuente: Solís, 2018	37
Figura 10. Bioensayo con ERPT al 100%, se analizaron las muestras por cuadruplicado colocando el inóculo de <i>C. vulgaris</i> en los matraces con muestra, a condiciones de aireación continua en una cámara de cultivo. Fuente: Solís, 2018.....	38
Figura 11. Extracción de compuestos orgánicos con hexano y cloroformo.	42
Figura 12. Evolución del crecimiento celular de <i>C. vulgaris</i> con forme aumentan los días.....	48
Figura 13. Absorción de fósforo total con <i>C. vulgaris</i>	48
Figura 14. Fotorreactor con muestra agua residual/alga, Fuente: Solís, 2018.....	49

Lista de Imágenes

Imagen 1. (Arriba) Bioensayo con <i>C. vulgaris</i> en cámara de cultivo, (abajo) muestras posterior a bioensayo	47
Imagen 2. Disoluciones del agua residual en caldo nutritivo, Fuente: Solís, 2018.....	54
Imagen 3. ERPT sembrada en agar Nutritivo, Fuente: Solís, 2018.....	54
Imagen 4. Diluciones en Agar Nutritivo Res1 (10^1) más concentrada a Res6 (10^6) menos concentrada Fuente: Solís, 2018.....	55
Imagen 5. Microorganismos presentes en el agua del efluente pretratado sembrada en agar MacConkey, Fuente: Solís, 2018	56
Imagen 6. Colonias de microorganismos determinadas en diluciones, sembradas en agar MacConkey, Fuente: Solís, 2018	56
Imagen 7. Identificaciones obtenidas en ChromoAgar de acuerdo con el tipo de bacteria sembrada Fuente: Solís, 2018	58
Imagen 8. Muestras microbiológicas de agua residual tratadas en orden Alga-Fotodegradación, Fuente: Solís, 2018	60
Imagen 9. Muestras microbiológicas de agua residual tratada en orden Fotodegradación-Alga, Fuente: Solís, 2018	61
Imagen 10. Diluciones decimales en Agar Nutritivo de Alga+ fotodegradación y fotodegradación+ alga, Fuente: Solis, 2018.....	61
Imagen 11. A1 muestras alga + fotodegradación, F1 muestras fotodegradación + alga, Fuente: Solis, 2018.....	62
Imagen 12. Crecimiento de <i>Daphnia magna</i> en soluciones al 50% y 100% de agua residual y agua tratada con <i>C. vulgaris</i> y fotodegradación.	70
Imagen 13. Montaje del ensayo con <i>Allium sativum</i>	71
Imagen 14. Crecimiento de raíces en ajos irrigados en concentraciones del ERP 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, Fuente: Solís, 2018	72
Imagen 15. Crecimiento de raíces en ajos irrigados con concentraciones de agua tratada con alga-fotodegradación al 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, Fuente: Solís, 2018.....	72
Imagen 16. A) Micrografía células del ensayo de agua residual al 100%, B) Micrografía células del ensayo agua tratada 100%	73
Imagen 17. Polinúcleos, B puente anafásico, C profase anómala D alargamiento celular, E, F, Metafase con cromosomas rotos, Fuente: Solís, 2018.	79

Lista de Tablas

Tabla 1. Impacto ambiental en las normativas y legislaciones en relación al agua.....	27
Tabla 2. Métodos e intervalos de los parámetros analizados.	33
Tabla 3. Densidad celular promedio en c/mL obtenida por cada solución del efluente	46
Tabla 4. Caracterización del agua en diferentes etapas.	51
Tabla 5. Caracterización de muestra significativa del agua en los diferentes ensayos realizados mensualmente, análisis significativo de todas las muestras.	52
Tabla 6. Caracterización de metales pesados determinados en biomasa de <i>C. vulgaris</i>	53
Tabla 7. Absorbancias obtenidas en el efluente, con tratamiento con <i>C. vulgaris</i> y con tratamiento fotoquímico	58
Tabla 8. Análisis estadístico comparativo de muestras.	59
Tabla 9. Compuestos orgánicos detectados en el ERPT por CG-MS, extracción con cloroformo .	63
Tabla 10. Compuestos orgánicos detectados en el ERPT por CG-MS, extracción con hexano.....	63
Tabla 11. Compuestos orgánicos detectados en agua tratada con <i>C. vulgaris</i> por CG-MS, extracción con hexano	64
Tabla 12. Compuestos orgánicos detectados en agua tratada con <i>C. vulgaris</i> por CG-MS, extracción con cloroformo	65
Tabla 13. Compuestos orgánicos detectados en agua tratada con <i>C. vulgaris</i> complementado con fotodegradación por CG-MS, extracción con cloroformo.....	66
Tabla 14. Compuestos orgánicos detectados en agua tratada con <i>C. vulgaris</i> complementado con fotodegradación por CG-MS, extracción con hexano	66
Tabla 15. Datos concentrados de los compuestos presentes en cada etapa del tratamiento, Rojo= Compuestos persistentes, Azul= Compuestos intermediarios de reacción.	67
Tabla 16. Compuestos orgánicos extraídos con etanol en un equipo Soxhlet de la biomasa.....	68
Tabla 17. Compuestos orgánicos extraídos con hexano en un equipo Soxhlet de la biomasa	68
Tabla 18. Datos concentrados de disoluciones de muestras de efluente residual	74
Tabla 19. Datos concentrados de disoluciones de agua tratada con <i>C. vulgaris</i> y fotodegradación	75
Tabla 20. Porcentaje de aberraciones, número de células en mitosis y porcentaje de índice mitótico.	77

Resumen

En este estudio se utilizó la biorremediación con el alga *Chlorella vulgaris* complementada con una degradación fotoquímica para el tratamiento de aguas residuales, del efluente de una planta de tratamiento de aguas residuales ubicada en la ciudad de Puebla, México. Se evaluó la eficiencia del alga en la remoción de nitrógeno, fósforo, metales pesados y la inactivación de microorganismos. Se obtuvo una remoción de un 95% de nitrógeno, un 75% de fósforo, 93% níquel y un 11% de plomo contenido en el efluente. La etapa fotoquímica inactivo microorganismos como *Salmonella*, *Shigella* y *E. coli*. Se determinaron los compuestos orgánicos solubles en hexano y en cloroformo presentes en el efluente, después de la biorremediación y después de la degradación fotoquímica por Cromatografía de gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS), se detectaron 13 compuestos orgánicos en el efluente y después de los tratamientos 4 compuestos intermediarios y un compuesto persistente (tetracloroetileno). Se realizaron pruebas de toxicidad con *Daphnia magna* y *Allium sativum* como bioindicador, se observó la disminución de las aberraciones cromosómicas de un 33% a 4%.

Abstract

In this study, bioremediation with *Chlorella vulgaris* algae was used, complemented with a photochemical degradation for the treatment of wastewater, from the effluent of a wastewater treatment plant located in the city of Puebla, Mexico. The efficiency of the alga was evaluated in the removal of nitrogen, phosphorus, heavy metals and the inactivation of microorganisms. A removal of 95% nitrogen, 75% phosphorus, 93% nickel and 11% lead contained in the effluent was obtained. The photochemical stage inactivate microorganisms such as *Salmonella*, *Shigella* and *E. coli*. The organic compounds soluble in hexane and chloroform present in the effluent were determined, after bioremediation and after photochemical degradation by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS), 13 organic compounds were detected in the effluent and after the treatments 4 intermediate compounds and a persistent compound (tetrachlorethylene). Toxicity tests were carried out with *Daphnia magna* and *Allium sativum* as a bioindicator, a decrease of chromosomal aberrations from 33% to 4% was observed.

I. INTRODUCCIÓN

El tratamiento de las aguas residuales es una cuestión prioritaria a nivel mundial, ya que es importante disponer de agua de calidad y en cantidad suficiente, lo que permite una mejora del ambiente, la salud y la calidad de vida. El uso de agua tratada en agricultura es una opción cada vez más utilizada en regiones con escasez de agua y poblaciones urbanas crecientes con una mayor demanda de agua de riego.

El tratamiento de aguas residuales consiste en cuatro etapas: pretratamiento tratamiento primario; tratamiento secundario, y el tratamiento terciario. La descarga de aguas residuales urbanas en cuerpos de agua introduce altos niveles de nitrógeno y fósforo que conducen a la eutrofización. La eliminación de nutrientes es un aspecto importante en el tratamiento de aguas residuales ya que la eutrofización es la principal causa del agotamiento de oxígeno en los ambientes acuáticos, aumentando la vegetación no deseada, la pérdida de flora y fauna acuática. Esto quiere decir que el aumento de nutrientes en el agua provoca un crecimiento acelerado de algas proliferantes y vegetación, causando un desequilibrio en los ecosistemas, siendo esto uno de los principales problemas en las aguas superficiales [1]. La eliminación de fósforo de las aguas residuales incluye un tratamiento químico seguido de un tratamiento físico; sin embargo, este método produce grandes cantidades de lodos residuales. Los procesos químicos inducidos por algas se han utilizado para eliminar el nitrógeno y el fósforo [2-4]. Las tecnologías de microalgas proporcionan una vía para la eliminación de nutrientes vitales como fósforo, nitrógeno y metales pesados[5,6].

La aplicación de microalgas en el tratamiento de aguas residuales, tiene sus antecedentes con estudios sobre la posibilidad de cultivos masivos de microalgas para tratar efluentes industriales [5]. *Chlorella vulgaris* ha sido ampliamente investigada por su alta capacidad de remoción de contaminantes presentes en aguas residuales así como también por el alto contenido de lípidos en su materia orgánica[8-10]. En comparación con los actuales procesos convencionales, el cultivo de microalgas genera biomasa susceptible de convertirse en materia prima para la producción de una elevada variedad de biocombustibles [7]. La versatilidad de las microalgas hace que sean utilizadas en diferentes ramos de la ciencia para diferentes aplicaciones como se muestra en la Figura 1.



Figura 1. Usos comunes de microalgas [8]

Otra opción de tratamiento de aguas se encuentra en los procesos avanzados de oxidación (AOP's por sus siglas en inglés) que son un grupo de técnicas de oxidativas que se lleva a cabo para transformar contaminantes orgánicos persistentes (COP) en el agua. Los AOP se pueden llevar a cabo de diferentes maneras. Estos se basan en la producción de radicales $\bullet\text{OH}$ que son no selectivos y altamente reactivos con la mayoría de los grupos funcionales. Otra técnica aplicada en el tratamiento de aguas es la cromatografía de gases combinada con espectrometría de masas la cual se ha utilizado tradicionalmente para identificar compuestos orgánicos e hidrocarburos hidrofóbicos de petróleo y gas en aguas [9] [10] y para cuantificar muchos de los compuestos en fluido de aguas residuales de toxicidad conocida[11]. Es necesario destacar que aunque una muestra de agua sea tratada física y químicamente, estos tratamientos no garantizan que no exista toxicidad en el agua, debido a las reacciones que ocurren a lo largo del tratamiento y a los compuestos intermediarios de reacción que se forman durante los diferentes procesos, por lo que evaluar la genotoxicidad es un complemento que permiten valorar la biodisponibilidad de contaminantes presentes en muestras compuestas por mezclas complejas [12]. Las plantas, al ser receptores directos de agro tóxicos, se convierten en material importante para la prueba genética y para el monitoreo ambiental de los casos afectados por dichos productos [13]. La aplicación de ensayos genotóxicos con *Allium cepa* y *Allium sativum* [14,15] han demostrado ser ensayos simples y confiables utilizados para registrar todas las aberraciones cromosómicas en células mitóticas [16]. Partiendo de la hipótesis inicial de que las microalgas pueden ser cultivadas

empleando aguas residuales el presente trabajo tiene el propósito de analizar la metabolización de fósforo, nitrógeno, y absorción de metales pesados mediante el alga *C. vulgaris* acoplado a la degradación fotoquímica, determinar los compuestos orgánicos presentes, disminuir la carga microbiana y evaluar la toxicidad del agua obtenida mediante el análisis celular de raíces de *Allium sativum*, con el objeto de evidenciar la calidad del agua al finalizar el proceso y posibilitarla para un uso.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La falta de coordinación entre usuarios y autoridades, la flexibilidad en las normativas, la falta de programas y recursos económicos destinados al adecuado tratamiento y empleo inadecuado de las aguas residuales generadas conducen a la sobre explotación de este recurso, la contaminación de ecosistemas provoca un impacto negativo sobre la salud humana. Ante esta problemática, el saneamiento de las aguas residuales adquiere más importancia para asegurar su recolección, transporte, tratamiento y recepción en los cuerpos de agua, en condiciones que no perjudiquen al medio ambiente y la salud de la población. Hoy en día, las técnicas basadas en las microalgas se han aplicado en el tratamiento de aguas residuales para la remoción de nutrientes. Las microalgas proporcionan una vía para la remoción de nitrógeno, fósforo y algunos metales pesados presentes en las aguas residuales, por ser utilizados como una fuente de alimentación para su crecimiento [4]. Algunos beneficios del uso de algas incluyen: absorción de metales pesados, ahorro de tiempo y energía, representa una metodología respetuosa del medio ambiente, fácil de usar durante todo el año, facilidad de manejo, bajo costo, relación superficie/volumen, no hay generación de desechos tóxicos, no requiere síntesis, y es útil en lotes y sistemas continuos[17]. Las algas marinas y los hongos, como las levaduras, absorben varios iones metálicos de soluciones acuosas por los grupos funcionales disponibles presentes en la pared celular [18]. *Chlorella vulgaris* ha sido ampliamente investigada por su alta capacidad de remoción de contaminantes presentes en aguas residuales, así como también por el alto contenido de lípidos en su composición orgánica [19]. Hay muchos estudios sobre *Chlorella vulgaris*, donde se ha demostrado el notable potencial en la absorción de hasta 97% de

nitrógeno y 86% de fosforo a partir de diferentes tipos de aguas residuales, como textiles, municipales, agrícolas y recalcitrantes [20], también ha presentado biosorción de metales pesados como Pb, Cr y Ni [21]. *Chlorella vulgaris* demostró una alta producción de lípidos utilizando aguas residuales tratadas como medio de cultivo [22], además representa una técnica que implica bajos costos. Teniendo en cuenta la alta tasa de crecimiento y absorción de nutrientes, *C. vulgaris* se considera como una de las mejores microalgas para la biorremediación de aguas residuales por su alto potencial para absorber nitrógeno, metales pesados y fósforo presentes en el medio y resultando ser un proceso prometedor y ventajoso. De manera complementaria la aplicación de un tratamiento fotoquímico garantiza la degradación de compuestos orgánicos presentes y la inactivación de patógenos causantes de enfermedades. Es importante sustentar la calidad del agua mediante estudios toxicológicos, por lo que se están desarrollando herramientas analíticas clásicas para establecer los impactos toxicológicos del agua residual con diferentes niveles de tratamiento. A pesar de lo difícil que resulta analizar todos los micro y macro contaminantes presentes en el efluente, las pruebas toxicológicas han demostrado una descripción de los posibles efectos negativos del cóctel en un efluente.

III. JUSTIFICACIÓN

El agua es uno de los recursos más importantes para el desarrollo de la vida, en ríos, lagos, ecosistemas aledaños y sobre todo para los seres vivos, la problemática en el manejo de este recurso se relaciona con aspectos como:

- El crecimiento acelerado de la población a nivel mundial que ha llevado a las localidades a un mayor consumo de sus recursos naturales.
- De un 100% del agua dulce en el mundo un 56% (2,212 km³ al año) se libera en el medio ambiente como aguas residuales en forma de efluentes municipales e industriales y agua de drenaje agrícola (UNESCO 2017).
- Estos efluentes ocasionan enfermedades como el cólera, tifus, gastroenteritis, hepatitis, así como efectos tóxicos a largo plazo.
- La mayoría de las ciudades no tienen o no asignan los recursos necesarios para la gestión y la infraestructura de las aguas residuales

- Las aguas residuales de las ciudades de los países en desarrollo se vierten directamente sin tratar en los ríos, lagos, arroyos o en el mar, causando eutrofización y alteraciones en los ecosistemas.
- El uso indiscriminado de fármacos y productos químicos crea mezclas complejas en las aguas residuales, que cada vez son más difíciles de tratar por la persistencia de estos contaminantes.
- En el caso de la ciudad de Puebla las plantas de tratamiento únicamente incluyen un proceso primario avanzado, por lo que el agua obtenida es de muy baja calidad.

Una posibilidad para dar solución a estos problemas es la biorremediación en aguas utilizando algas para la remoción de contaminantes este tipo de tecnología ha resultado altamente eficiente, ya que implica bajos costos y un lapso corto de experimentación. Un complemento que puede mejorar esta metodología es la aplicación de método fotoquímico ya que contribuye a la inactivación de microorganismos y la degradación de contaminantes. Con base en esta evaluación, se inició la búsqueda de una metodología, capaz de remover elementos como fósforo, nitrógeno, metales pesados, compuestos orgánicos y microorganismos, los cuales se encuentran presentes en las aguas residuales. En relación con lo antes mencionado, en el presente trabajo se estudió la capacidad de metabolización y absorción de fósforo, nitrógeno y metales pesados presentes en las aguas residuales de una planta de tratamiento del estado de Puebla utilizando el alga *Chlorella vulgaris* complementado con un tratamiento fotoquímico, se realizó un estudio de los compuestos orgánicos presentes mediante cromatografía de gases acoplado a masas y se evaluó la toxicidad aguda y la genotoxicidad posterior al uso de este tratamiento, todo esto con el fin de proponer una técnica que mejore la calidad del agua proveniente de un efluente residual.

IV. HIPÓTESIS

El tratamiento de agua residual con *C. vulgaris* complementado con degradación fotoquímica, promueve la absorción de metales pesados y metabolización de fósforo y nitrógeno, remueve compuestos orgánicos presentes, inactiva patógenos y disminuye la toxicidad, mejorando la calidad final del agua.

V. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Permite el tratamiento de agua residual con *C. vulgaris* complementado con una fotodegradación disminuir la toxicidad y mejorar la calidad del agua obtenida?

VI. OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar la absorción de metales pesados, así como la metabolización de fósforo y nitrógeno mediante *C. vulgaris*, completado con la degradación fotoquímica de aguas residuales en un efluente de una planta de tratamiento de la ciudad de Puebla y evaluar la calidad de esta agua.

Objetivos específicos

- Caracterizar el agua residual de la planta de tratamiento para garantizar su uso como medio de crecimiento de *C. vulgaris*.
- Determinar la eficiencia del alga *C. vulgaris* en la metabolización de nitrógeno, fósforo y así como la absorción de metales pesados.
- Aplicar un tratamiento fotoquímico para potencializar o mejorar la calidad de agua tratada previamente con el alga.
- Determinar los compuestos orgánicos presentes en agua antes y después del tratamiento.
- Determinar los compuestos orgánicos y metales pesados absorbidos en la biomasa de *C. vulgaris*.
- Determinar la calidad del agua midiendo la toxicidad presente mediante dos metodologías diferentes (*Daphnia magna* y *Allium sativum* como bioindicadores)
- Determinar la toxicidad en el agua tratada en comparación con la muestra inicial.

VII. MARCO TEÓRICO

7.1 Distribución del agua

El agua es un recurso natural indispensable para la vida. Constituye una necesidad primordial para la salud, por ello debe considerarse uno de los derechos humanos básicos. En las sociedades actuales el agua se ha convertido en un bien muypreciado, debido a la escasez, es un sustento de la vida y del desarrollo económico. El ciclo natural del agua tiene una gran capacidad de autodepuración. Pero esta misma facilidad de regeneración y su aparente abundancia hace que sea el vertedero habitual de residuos: plaguicidas, desechos químicos, metales pesados, residuos radiactivos, generando contaminación en ríos, lagos, y mantos acuíferos, con el paso del tiempo aumenta la contaminación presente en los cuerpos de agua y sobre todo es más difícil mitigar la problemática. El tratamiento de aguas viene desde tiempos muy antiguos, pero ha sido en este siglo cuando se ha extendido este problema a ríos y mares de todo el mundo. En la Figura 2 se presentan los volúmenes de las reservas de agua mundiales, el 97% del agua se encuentra en mares y océanos en forma salada, lo que la hace inutilizable directamente para la alimentación, la agricultura y la mayor parte de usos en la industria. El 2.99% del agua restante es dulce, pero casi toda ella se encuentra en los hielos de los polos o glaciares, en depósitos subterráneos profundos; en general la mayor parte de agua dulce se encuentra en glaciares y bloques de hielo (99.35%) y los porcentajes más bajos corresponden a las aguas de los lagos, atmósfera y ríos.

La disponibilidad del agua de una región o país depende del balance de agua, esto es, del volumen que se recibe por precipitación y de lo que se pierde por la evaporación de los cuerpos de agua y por la evapotranspiración de la vegetación. El volumen restante puede dirigirse hacia la recarga de los acuíferos o escurrir superficialmente. Debido a que la distribución de la precipitación y de la evapotranspiración varía notablemente, la disponibilidad de recursos hídricos muestra diferencias muy importantes en las diferentes regiones del planeta.

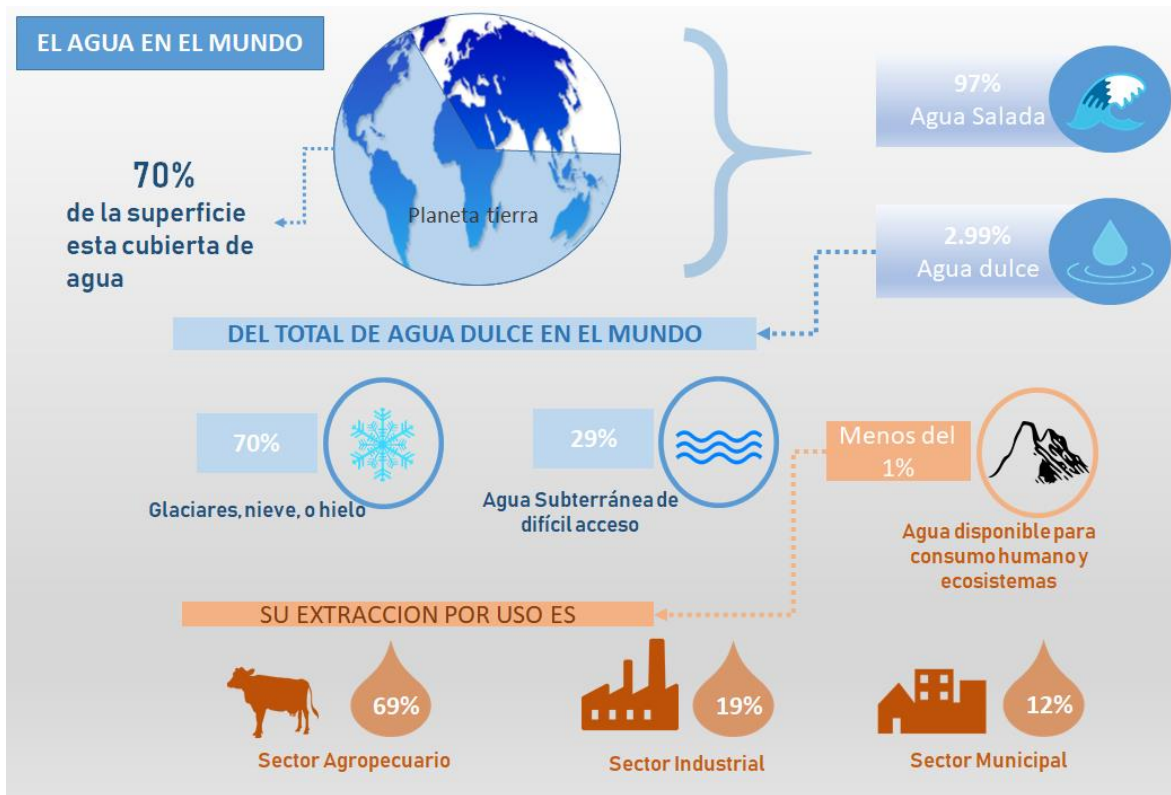


Figura 2. Distribución del agua a nivel mundial [23], adaptada por Solís 2018.

7.2 Tipos de contaminación de agua

Hay un gran número de contaminantes del agua que se pueden clasificar en los siguientes:

Microorganismos patógenos. Son los diferentes tipos de bacterias, virus, protozoos y otros organismos que transmiten enfermedades como el cólera, tifus, gastroenteritis diversas, hepatitis, etc. En los países en vías de desarrollo las enfermedades producidas por estos patógenos son uno de los motivos más importantes de muerte prematura, sobre todo de niños. Normalmente estos microorganismos llegan al agua en las heces y otros restos orgánicos que producen las personas infectadas. Por esto, un buen índice para medir la salubridad de las aguas, en lo que se refiere a estos microorganismos, es el número de bacterias coliformes presentes en el agua. La OMS recomienda que en el agua para beber presente 0 UFC de coliformes por 100 mL de agua.

Desechos orgánicos. Son el conjunto de residuos orgánicos producidos por los seres humanos, ganado, etc. Incluyen heces y otros materiales que pueden ser descompuestos por bacterias

aeróbicas, es decir en procesos con consumo de oxígeno. Cuando este tipo de desechos se encuentran en exceso, la proliferación de bacterias agota el oxígeno, y ya no pueden vivir en estas aguas peces y otros seres vivos que necesitan oxígeno. Los índices para medir la contaminación por desechos orgánicos son la cantidad de oxígeno disuelto, OD en agua o la DBO (Demanda Biológica de Oxígeno).

Sustancias químicas inorgánicas. En este grupo están incluidos ácidos, sales y metales tóxicos como el mercurio y el plomo. Causan graves daños a los seres vivos, disminuyen los rendimientos agrícolas y corroer los equipos que se usan para trabajar con el agua.

Nutrientes vegetales inorgánicos. Nitratos y fosfatos son sustancias solubles en agua que las plantas necesitan para su desarrollo, pero si se encuentran en cantidad excesiva inducen el crecimiento desmesurado de algas y otros organismos provocando la eutrofización de las aguas. Cuando estas algas y otros vegetales mueren, al ser descompuestos por los microorganismos, se agota el oxígeno y se hace imposible la vida de otros seres vivos. El resultado es un agua maloliente e inutilizable.

Compuestos orgánicos. Muchas moléculas orgánicas como petróleo, gasolina, plásticos, plaguicidas, disolventes, detergentes, etc. acaban en el agua y permanecen, en algunos casos, largos períodos de tiempo, porque, al ser productos fabricados por el hombre, tienen estructuras moleculares complejas, muy estables, difíciles de degradar por los microorganismos.

Sedimentos y materiales suspendidos. Muchas partículas arrancadas del suelo y arrastradas a las aguas, junto con otros materiales que hay en suspensión en las aguas, en términos de masa total, la mayor fuente de contaminación del agua. La turbidez que provocan en el agua dificulta la vida de algunos organismos, y los sedimentos que se van acumulando destruyen sitios de alimentación o desove de los peces, rellenan lagos o pantanos y obstruyen canales, ríos y puertos.

Sustancias radiactivas. Isótopos radiactivos solubles pueden estar presentes en el agua y a veces, se pueden ir acumulando a lo largo de las cadenas tróficas, alcanzando concentraciones considerablemente más altas en algunos tejidos vivos que las que tenían en el agua.

Contaminación térmica. El agua caliente liberada por centrales de energía o procesos industriales eleva, en ocasiones, la temperatura de ríos o embalses con lo que disminuye su capacidad de disolver gases, entre ellos oxígeno y afecta a la vida de los organismos.

7.3 Contaminación a nivel mundial

Según el informe mundial de las Naciones Unidas sobre el desarrollo de los recursos hídricos en el 2017 [24], 663 millones de personas aún viven sin acceso a agua potable mejorada. A nivel mundial, más de 80% de las aguas residuales que se generan vuelve a los ecosistemas sin ser tratada ni reciclada. 1,800 millones de personas usan una fuente de agua contaminada por material fecal, lo que las coloca en riesgo de contraer cólera, disentería, tifus o polio.

842 mil muertes al año a nivel global se producen por la falta de agua potable, pobres infraestructuras sanitarias y la falta de higiene. Para 2050 se estima que aproximadamente 70% de la población viva en ciudades (actualmente 50% lo hace). Hoy en día la mayoría de las ciudades de los países en desarrollo no disponen de la infraestructura o recursos adecuados para gestionar las aguas residuales de forma eficiente y sostenible, lo cual abre un sinfín de oportunidades de explotar las aguas residuales como recurso. En promedio los países de altos ingresos tratan cerca de 70% de sus aguas residuales urbanas que generan, mientras que los de ingresos medianos altos el porcentaje es de 38%, los de ingresos medios bajos de 28% y los de ingresos bajos solo 8%.

La perspectiva para el año 2030 la demanda de agua a nivel mundial aumente 50% de lo que se requiere hoy en día. 22% del uso mundial del agua corresponde a su consumo industrial [25].

7.4 Contaminación del agua en México

México recibe alrededor de 1,489 mil millones de metros cúbicos al año de agua en forma de precipitación, de los cuales el 67% cae entre junio y septiembre, sobre todo en la región sureste (Chiapas, Oaxaca, Campeche, Quintana Roo, Yucatán, Veracruz y Tabasco), donde se recibe 49.6% de la lluvia [26].

La contaminación de los cuerpos de agua es producto de las descargas de aguas residuales sin tratamiento, ya sea de tipo doméstico, industrial, agrícola, pecuario o minero Figura 3. A finales del año 2010, más de 70% de los cuerpos de agua del país presentaba algún indicio de contaminación [27].

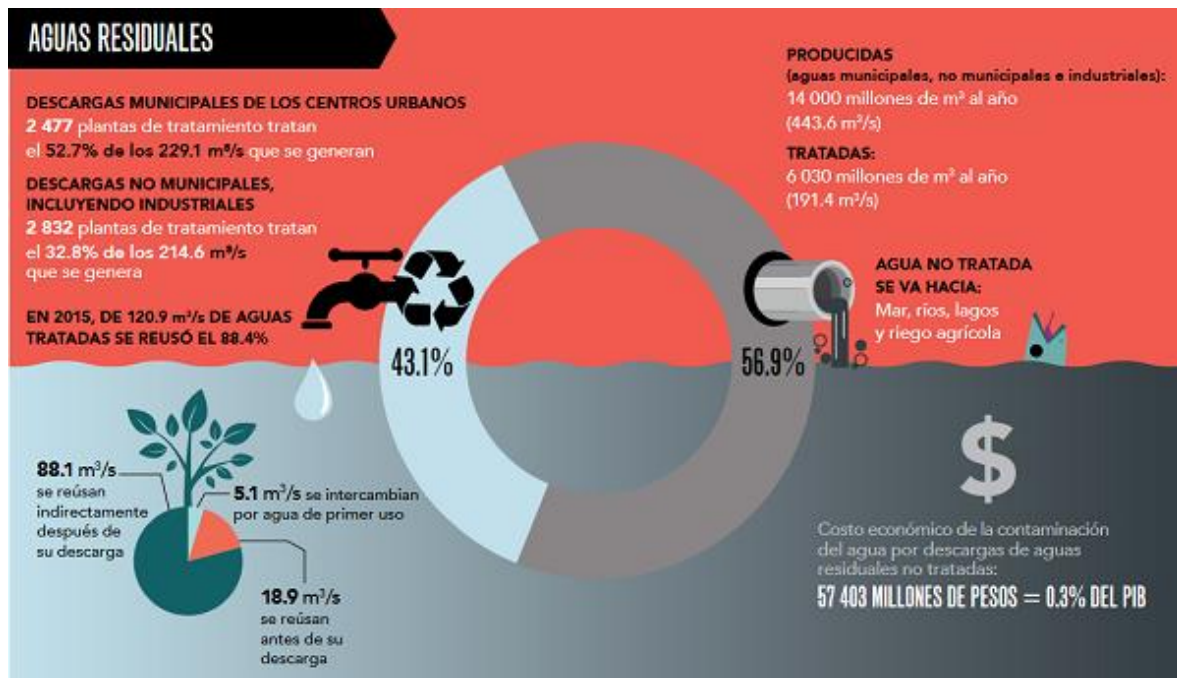


Figura 3. Agua residual en México, Fuente: CENTRO VIRTUAL DE INFORMACION DEL AGUA

Si bien la industria autoabastecida sólo consume 4% del agua total (3.5 km³ anuales), la contaminación que genera en demanda biológica de oxígeno es tres veces mayor que la que producen 100 millones de habitantes. En 2009, los giros industriales con mayores descargas contaminantes sumaban un volumen total de 176 m³/s. La actividad con mayor volumen de descarga es la acuicultura, con 68 m³/s (39%), seguida por la industria azucarera 46 m³/s, la petrolera 12 m³/s, los servicios 11 m³/s y la química 7 m³/s según la Comisión Nacional del Agua en 2009. La industria azucarera es la que produce la mayor cantidad de materia orgánica contaminante y la petrolera y química las que producen los contaminantes de mayor impacto ambiental. El sector industrial compite por el uso del agua con otros sectores productivos, particularmente con el agrícola [28]

7.5 Contaminación de agua en Puebla

Una cuarta parte de los ríos más contaminados de México se encuentra en Puebla. CONAGUA identificó 17 cuencas con niveles inaceptables de coliformes fecales, sólidos suspendidos totales, demanda biológica y química de oxígeno, cuatro de ellas están en territorio estatal. Se trata de los ríos Atoyac, Alseseca y Nexapa, además parte del Zahuapan (que también se encuentra en el

estado de Tlaxcala) 5 municipios en el estado carecen de servicio de recolección de sus desechos sólidos. Esto significa que en todo el territorio poblano hay 226 puntos donde los municipios descargan aguas contaminadas, desechos de hogares e industrias sin ningún tipo de tratamiento, y que no tienen ningún tipo de control. De los 217 municipios que hay en la entidad todos tendrían al menos un punto de descarga de aguas negras. De esos 226 lugares de descarga 124 van a dar directamente a barrancas y suelos, mientras que 89 están conectados a ríos y arroyos y dos más a lagos y lagunas. El resto, a otros lugares no especificados. Dichos datos se desprenden de los tabulados básicos del Módulo Ambiental del Instituto Nacional de Geografía y Estadística, edición 2011 [29].

La situación de esos cuerpos de agua podría empeorar, pues en la Secretaría de Sustentabilidad Ambiental y Ordenamiento Territorial de Puebla (SSAOT) del gobierno de Puebla no se establece qué se está haciendo para remediar la contaminación que sigue descargándose a barrancas, suelos, ríos, lagos y lagunas de la entidad. Algunos reportes han demostrado la presencia de As y Pb estos niveles superaron las normas nacionales e internacionales establecidas para agua de consumo humano y protección de la vida acuática.[30] Se han realizado investigaciones sobre el grado deterioro del Rio Atoyac, los resultados mostraron que los parámetros de campo indican el daño en el río causado por la contaminación debida a los asentamientos humanos y al desarrollo industrial al efectuar sus descargas en este cuerpo de agua, a pesar de haber dado un tratamiento pre- vio a las mismas, lo cual resalta la necesidad de incluir pruebas de toxicidad y mutagenicidad en la legislación vigente [31].

En el estado no existe un informe oficial que establezca cuál es la situación de contaminación de los cuerpos de agua, salvo algunos informes académicos como el elaborado durante 2009 por especialistas universitarios y financiados por el ayuntamiento de Puebla, que lleva por título Contaminación del agua en el municipio de Puebla.

Ahí se resume que el norte y el nororiente de la capital del estado son las zonas que más padecen la polución del agua debido al alto número de industrias textiles, químicas, de acero, embotelladoras y de alimentos, las cuales descargan sus aguas residuales en forma directa y sin control hacia alguno o varios ríos o arroyos, particularmente sobre el río Atoyac, el cual está al borde de la desaparición si continúa recibiendo descargas residuales. De acuerdo con el informe

de CONAGUA [32], Puebla cuenta con 143 plantas de tratamiento, únicamente se encuentran en funcionamiento 78 plantas de tratamiento, distribuidas en 59 municipios de los 217 que conforman el estado. La planta de san Francisco que se encuentra en la capital de estado es la que trata una mayor cantidad de agua residual (1,100 L/s) mediante un proceso primario avanzado (desarenado, desengrasado y clarificación) por lo que el agua procedente de este efluente cuenta con una alta cantidad de contaminantes.

7.6 Tratamiento de aguas residuales

Las aguas residuales se pueden definir como aquellas que, por uso del hombre, representan un peligro y deben ser desechadas, porque contienen gran cantidad de sustancias y/o microorganismos [33]. Una de las prácticas más comunes de disposición final de las aguas residuales domésticas ha sido la disposición directa sin tratamiento en los cuerpos de agua superficiales y en el suelo; sin embargo, la calidad de estas aguas puede generar problemas de salud pública, particularmente importantes en países tropicales por la alta incidencia de enfermedades infecciosas, cuyos agentes patógenos se dispersan en el ambiente de manera eficiente a través de las excretas o las aguas residuales crudas [34].

7.6.1 Pretratamiento

Es esencialmente físico; la primera etapa de la descontaminación, en esta fase se remueven sólidos presentes en las aguas residuales, a través de rejillas, aquí se remueve grava, arena, rocas, semillas y basura que arrastra el agua al llegar a la planta.

7.6.2 Tratamiento Primario

Esta etapa es la remoción física de contaminantes, se realiza en tanques de sedimentación, el lodo es principalmente uno de estos contaminantes, este es removido y procesado, para posteriormente después de caracterizarlo puede darle un uso agrícola.

7.6.3 Tratamiento Secundario

Es esencialmente biológico, en esta etapa suelen utilizarse plantas o microorganismos capaces de remover contaminantes. En el tratamiento primario, la aireación y la incorporación de oxígeno al agua, contribuye al crecimiento bacteriano para llevar a cabo la eliminación de materia orgánica biodegradable en esta etapa.

7.6.4 Tratamiento terciario

Después de los tratamientos anteriores, en esta parte del tratamiento se ha logrado eliminar gran parte de los contaminantes en las aguas residuales, el agua aun cuenta con algunos nutrientes que no se han removido y esto favorece el crecimiento de la flora acuática como algas proliferantes y lirios, el fosforo y el amoniacó proveniente del escurrimiento agrícola, de los desechos humanos y del uso de detergentes, son algunos de estos contaminantes, para removerlos se utilizan filtros y métodos de desinfección avanzados.

7.6.5 Biorremediación

Este tipo de tratamientos se basan en el empleo de microorganismos, plantas, humedales, y plantas acuáticas estos tratamientos son preferidos siempre que sea posible, ya que tienen mayores rendimientos con menores costes económicos en mantenimiento, y remueven completamente los contaminantes, transformándolos en sustancias inocuas como el dióxido de carbono, el metano, el nitrógeno molecular y el agua. Un ejemplo es la mineralización de compuestos contaminantes mediante microorganismos [35].

7.6.6 Tecnologías fotoquímicas

La capacidad de los radicales hidroxilos de oxidar compuestos orgánicos sugiere también la utilidad de explorar su generación fotoquímica, el uso de luz ultravioleta proporciona ciertas ventajas en el tratamiento de aguas y efluentes, que no se limitan al aprovechamiento del $\bullet\text{OH}$ como oxidante. La eficiencia de la destrucción fotoquímica de un compuesto puede alterarse drásticamente en función del diseño del reactor (tipo de lámpara, geometría, hidrodinámica,

etc.), lo que incide sobre el consumo de energía eléctrica y los costos. Las sustancias de elevada absorptividad, o con altos tenores de sólidos en suspensión, disminuyen la eficiencia cuántica debido a la pérdida de luz, por dispersión y/o absorción competitiva.

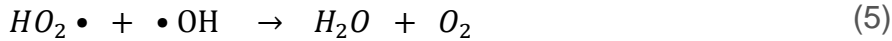
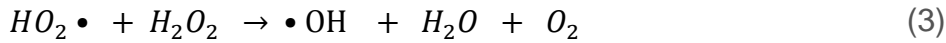
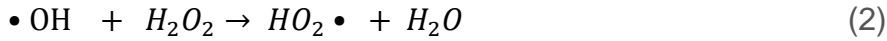
7.7 Sistema UV/H₂O₂

La fotólisis homolítica del H₂O₂ se realiza casi siempre utilizando lámparas de vapor de mercurio de baja o media presión. Cerca del 50% del consumo energético se pierde en forma de calor o de emisiones por debajo de 185 nm, que son absorbidas por la camisa de cuarzo. Generalmente se usan lámparas de 254 nm, pero como la absorción del H₂O₂ es máxima a 220 nm, sería más conveniente el uso de lámparas de Xe/Hg, más caras, pero que emiten en el rango 210-240 nm



Además del H₂O₂ ($\epsilon = 18,6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 254 nm), otras especies pueden absorber los fotones. Si los contaminantes se fotolizan directamente, mejora la eficiencia del proceso de destrucción oxidativa. Como la intensidad de la radiación UV decae exponencialmente hacia el seno de la solución, es necesario establecer condiciones de flujo turbulento para renovar continuamente la solución en las cercanías de la fuente luminosa. El proceso fotoquímico es más eficiente en medio alcalino, ya que la base conjugada del peróxido de hidrógeno (HO₂⁻) tiene una absorptividad mayor ($\epsilon_{254} = 240 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). El uso de UV/peróxido ofrece grandes ventajas: el oxidante es comercialmente muy accesible, es térmicamente estable y puede almacenarse. Como posee solubilidad infinita en agua, no existen problemas de transferencia de masa asociados a gases, como en el caso del ozono. Es una fuente efectiva de •OH, produciendo 2•OH por cada H₂O₂ (reacción 1). La inversión de capital es mínima y la operación es simple. En contraposición, dada la baja sección eficaz de absorción de H₂O₂ a 254 nm, se necesitan altas concentraciones del oxidante. El método no es efectivo para degradar alcanos fluorados o clorados, que no son atacados por •OH y tiene baja eficiencia para tratar aguas de alta absorbancia a $\lambda < 300 \text{ nm}$. En

exceso de peróxido y con altas concentraciones de $\bullet\text{OH}$, tienen lugar reacciones competitivas que producen un efecto inhibitorio para la degradación [36].



7.8 Uso de aguas residuales

La escasez de agua que día a día ha sido mayor debido al crecimiento demográfico, la urbanización y probablemente el cambio climático ha propiciado el uso de las aguas residuales para la agricultura, la acuicultura, la recarga subterránea y otras áreas. En muchos casos las aguas residuales son el único recurso de las comunidades pobres que sobreviven de la agricultura. Así pues, el uso de las aguas residuales en la agricultura aporta grandes beneficios, su uso no controlado está relacionado con un gran impacto a la salud humana, estos impactos pueden minimizarse cuando se implementan buenas prácticas de manejo en el uso y tratamiento de las aguas. El uso seguro de las aguas residuales en la agricultura debe encontrar un balance justo entre la maximización de los beneficios de salud pública y la ventaja de usar recursos escasos con gran cantidad de nutrientes. Es necesario que los procesos sean lo suficientemente flexibles para poder adaptarse a las condiciones locales, sociales, económicas y ambientales. Además, se debe implementar paralelamente con intervenciones de salud como la higiene, y el saneamiento adecuado. Por lo que, en 1989, la OMS publicó las Guías sobre el uso seguro de aguas residuales en la agricultura y acuicultura, esta guía marca las principales características de este tipo de agua entre las cuales esta su composición la cual consta de 99% de agua y 1% de sólidos suspendidos, coloidales y disueltos, compuestos orgánicos e inorgánicos, incluyendo macronutrientes como nitrógeno, fósforo y potasio, así como micronutrientes esenciales. Los efluentes industriales pueden agregar compuestos tóxicos, pero no en cantidades perjudiciales, y sólo se debe tener en cuenta la sensibilidad del cultivo que se está regando [37].

7.9 Uso de *Chlorella vulgaris* en biorremediación

Una característica importante de los sistemas de microalgas es su versatilidad, lo que permite enlazar diferentes aplicaciones dentro del mismo proceso, Las microalgas pueden remover el nitrógeno y el fósforo de aguas residuales de manera eficiente y, por tanto, tienen el potencial para jugar un importante papel de remediación durante el tratamiento terciario de aguas residuales [38]. Otra característica atractiva de las microalgas, en comparación con otros microorganismos, es su capacidad fotosintética para convertir la energía solar en biomasa valiosa con una interesante composición bioquímica. Como tal, las microalgas podrían desempeñar un papel importante en la biotecnología solar[37]. El género *Chlorella* es muy tolerante y puede crecer con éxito en aguas residuales como un medio de cultivo [39]. Un estudio con *C. vulgaris* demostró la absorción de 45-97% de nitrógeno, 28-96% de fósforo y en la reducción de la demanda química de oxígeno de 61-86% de diferentes tipos de aguas residuales como textiles, aguas residuales, municipales, agrícolas y recalcitrantes [40]. Siendo una vía para la eliminación de nutrientes vitales (nitrógeno y fósforo), dióxido de carbono y metales pesados presentes en las aguas residuales y necesarios para su crecimiento. Además, el ahorro y los requisitos para la remediación química y la posible minimización del uso de agua dulce para la producción de biomasa [19]. Así, *C. vulgaris* se considera como una de las mejores microalgas para biorremediación de aguas residuales por su versatilidad y baja proliferación, con esto, su aplicación en el tratamiento de aguas es ventajosa, por ser un proceso de absorción natural que evita la intervención de compuesto químicos contaminantes.

7.10 Marco legal

En relación con esta problemática a continuación se presentan algunas leyes y normas relacionadas al tratamiento y manejo de aguas que se mencionaron en el presente trabajo, a continuación se presenta la Tabla 1 donde se hace un breve análisis con las principales normas y legislaciones en relación al manejo del recurso hídrico junto con un breve análisis del impacto ambiental con el que desencadena directamente un problema en la del impacto ambiental que tiene cada una de las normas y leyes establecidas relacionado directamente a una problemática.

Tabla 1. Impacto ambiental en las normativas y legislaciones en relación al agua.

<i>Normativa</i>	<i>Impacto ambiental</i>
<p><i>Ley de Aguas Nacionales</i></p> <p><i>Ley Federal de Derechos - CAPITULO XIV - Derecho por Uso o Aprovechamiento de Bienes del Dominio Público de la Nación como Cuerpos Receptores de las Descargas de Aguas Residuales.</i></p> <p>☐ <i>Ley del Agua para el Estado de Puebla</i></p> <p>☐ <i>NOM-001-SEMARNAT-1996, Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales.</i></p> <p>☐ <i>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.</i></p> <p>☐ <i>NOM-003-SEMARNAT-1997, Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes para las aguas residuales tratadas que se reusen en servicios al público.</i></p> <p>☐ <i>NMX-AA-003-1980 Aguas Residuales- Muestreo</i></p> <p>☐ <i>NORMA Oficial Mexicana NOM-CCA/032-ECOL/1993, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las aguas residuales de origen urbano o municipal para su disposición mediante riego agrícola</i></p>	<p>El gobierno controla y decide el uso y manejo del recurso hídrico</p> <p>Agua como un recurso económico, explotación de mantos acuíferos y extracción mediante cuotas, uso de comisiones para mejorar la infraestructura del alcantarillado y drenaje.</p> <p>Distribución desigualitaria en el territorio.</p> <p>Límites permisibles por arriba a lo estipulado en comparación con Europa, no se toman en cuenta compuesto orgánicos, toxicidad.</p> <p>No existe especificaciones de acuerdo con el tipo de agua que se trata, no menciona un tipo de tratamiento específico de acuerdo a la procedencia de efluente (industrial, hospitalario, etc), el cobro por descarga que sobrepasan los límites es muy bajo.</p> <p>El tiempo de análisis de muestra es mensual lo que significa una variación en las muestras, se toman 5 parámetros para determinar la calidad del agua, entre estos determinar coliformes fecales, dando un límite permisible de 240 NMP/mL, comparado con la normativa de otros países otros países estos parámetro superan los límites sugeridos.</p> <p>Por ser una NMX las recomendaciones que sugieren no son obligatorias por lo que no existe un rigor específico normado.</p> <p>Los métodos de prueba se basan en NMX por lo que hace que su aplicación sea voluntaria y modificable, no existen comparación con alguna legislación internacional, no existe normativa para compuestos orgánicos persistentes.</p>

7.11 Relación Sociedad-Medio ambiente

La Figura 4 muestra las diferentes interacciones que existen alrededor de la problemática en el tratamiento de aguas, en donde se analiza las relaciones que desencadena, llevando a la sociedad

a una red compleja, donde se engloban aspectos políticos, sociales, económicos, tecnológicos y sobre todo la salud humana. En la figura 4 se presentan como bases 4 factores determinantes, el ambiente, las variables respuestas, el objeto de estudio y el hombre o sociedad.

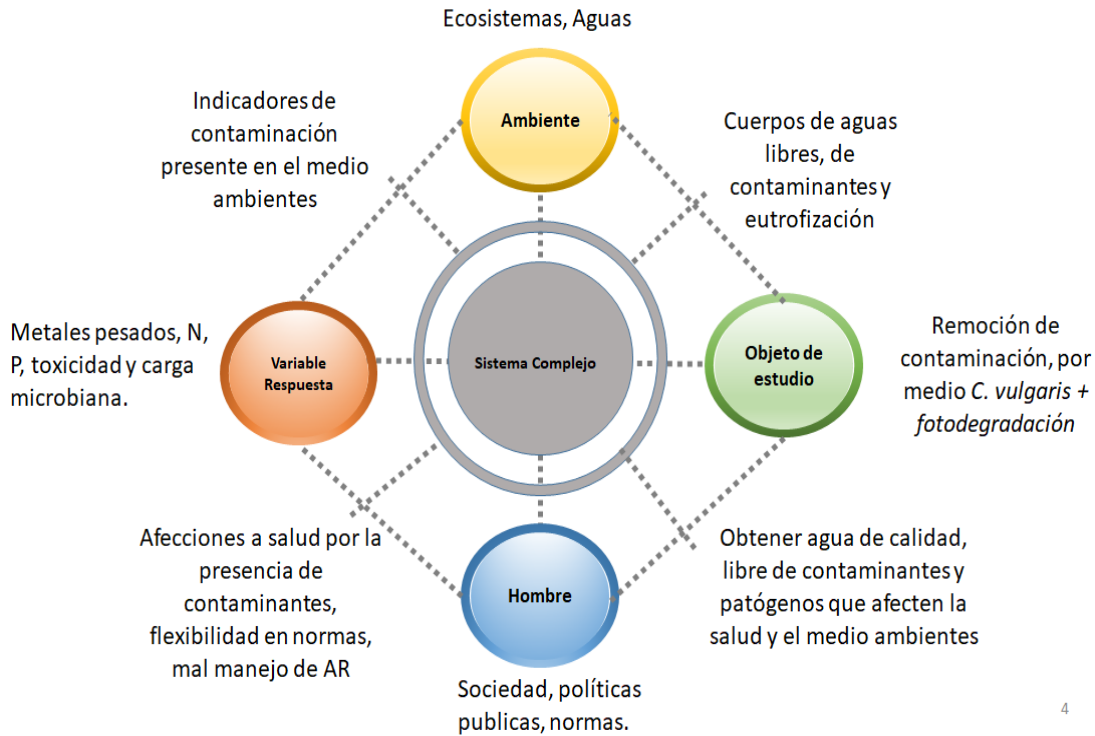


Figura 4. Integraciones que existen en el tratamiento de aguas

Por lo anteriormente expuesto, la presente investigación se dedica a buscar la posibilidad y las condiciones para la aplicación de un proceso de biorremediación, con el uso de *Chlorella vulgaris* complementado con un tratamiento fotooxidativo, una tecnología avanzada y limpia, para el tratamiento de aguas residuales y evaluar la toxicidad después de estos tratamientos.

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

El tipo de investigación que se plantea para este trabajo es del tipo experimental. En el caso de nuestro tema de investigación debido a las características y la experimentación se encuentra en una racionalidad sustantiva (ideal, estricta o instrumental) que está orientada al manejo de datos obtenidos en la experimentación y supone que se pueden predecir las consecuencias, asociadas a las alternativas. Así mismo la fase de laboratorio se llevó a cabo en diferentes instalaciones y laboratorios de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

8.1 Muestras

La fase de campo consistió en la toma de muestra esta se realizó en el efluente de la Planta de Tratamiento de San Francisco, ubicada en Blvd. Kepler S/N, Reserva Territorial Atlixcáyotl de la ciudad de Puebla, en la Figura 5 se muestran las diferentes etapas por las que pasa el agua residual para ser tratada en la planta de tratamiento, cabe mencionar que la planta cuenta únicamente con un tratamiento primario avanzado por lo que como se muestra en el diagrama, los principales procesos que se realizan es la remoción de materia orgánica y las grasas, un proceso de floculación para separar los lodos y una desinfección, por lo que el agua analizada aun contiene contaminantes de diferentes variedades.

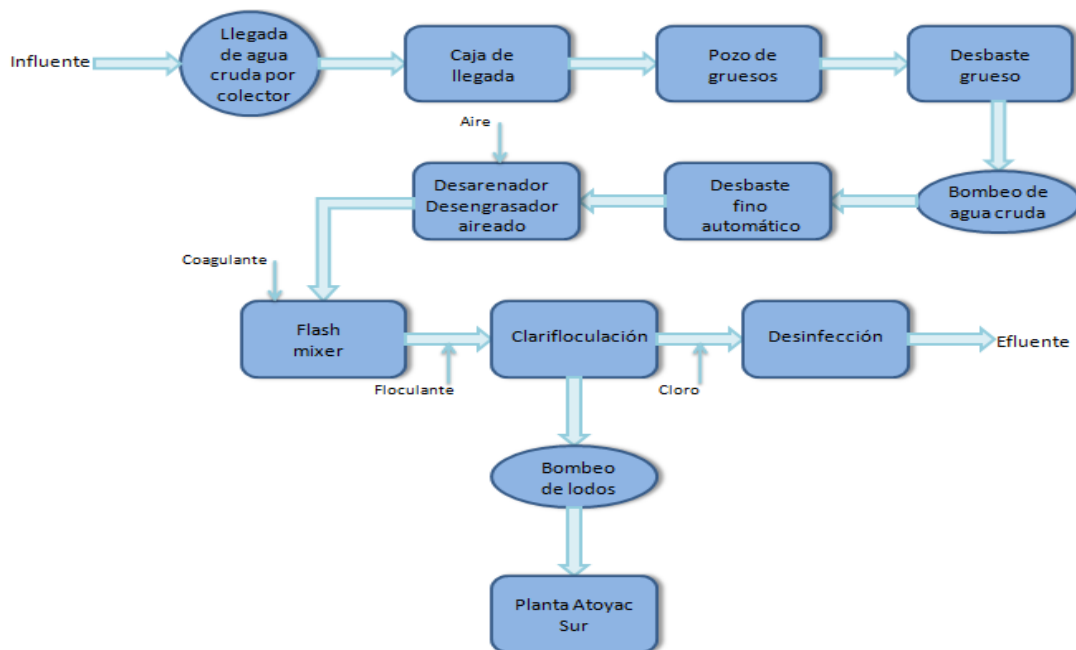


Figura 5 Esquema de planta de tratamiento

La planta de tratamiento de San Francisco cuenta únicamente con un proceso primario avanzado para el tratamiento de aguas el tratamiento de las aguas residuales inicia cuando el influente llega a la planta de tratamiento donde es colectado en un tanque de almacenamiento para posteriormente pasar por el pozo de gruesos el cual consta de una reja instalada, llamada reja de muy gruesos, que no es más que una serie de vigas de acero colocadas en vertical en la boca de entrada a la planta, que impiden la entrada de troncos, basura o materiales demasiado grandes que romperían o atorarían la entrada de caudal en la planta, posteriormente el efluente pasa por la etapa de desbaste de fino, que igual que en el desbaste grueso se encarga de retener material sólido capaz de impedir o disminuir el caudal, en este caso las rejillas constan de un tamaño mucho menor al desbaste grueso, en este caso retiene sólidos de menor tamaño. Posteriormente se continúa con el desarenador donde el objetivo de esta operación es eliminar todas aquellas partículas de granulometría superior a 200 micras, con el fin de evitar que se produzcan sedimentos en los canales y conducciones, para proteger las bombas y otros aparatos contra la abrasión, y para evitar sobrecargas en las fases de tratamiento siguiente por lo que se inyecta una cantidad de aire que provoca un movimiento helicoidal del líquido y crea una velocidad de barrido de fondo constante, en la siguiente etapa se agregan floculantes y coagulantes en esta etapa se mezcla y se agita lentamente para inducir la agrupación de partículas entre sí para formar “flóculos”. El agua se traslada entonces a un depósito tranquilo de sedimentación para sedimentar los sólidos y pasar al proceso de clarifloculación que no es más que un tratamiento químico-físico de las aguas que consiste, en la eliminación de las sustancias suspendidas de donde se obtienen los lodos que son destinados como enmendadores de suelo en algunos puntos del sur de la ciudad de Puebla. Como último paso el agua libre de sólidos pasa por un proceso de desinfección, cabe mencionar que con anterioridad la planta usaba cloro para esta parte de tratamiento, pero debido a los efectos ambientales que se pueden presentar se optó por dejar de utilizarlo, por lo que el efluente ya tratado es vertido directamente al río Atoyac.

La metodología que se utilizó para la toma de muestra se realizó de acuerdo con la norma la NMX-AA-003-1980 un esquema de esta norma se presenta en la Figura 6. Se recolectaron 4 muestras simples tomando muestra cada 6 horas para conformar la muestra compuesta. La toma de

muestra en la planta se realizó durante los meses de septiembre a febrero, visitando la planta cada mes para la toma de muestra.

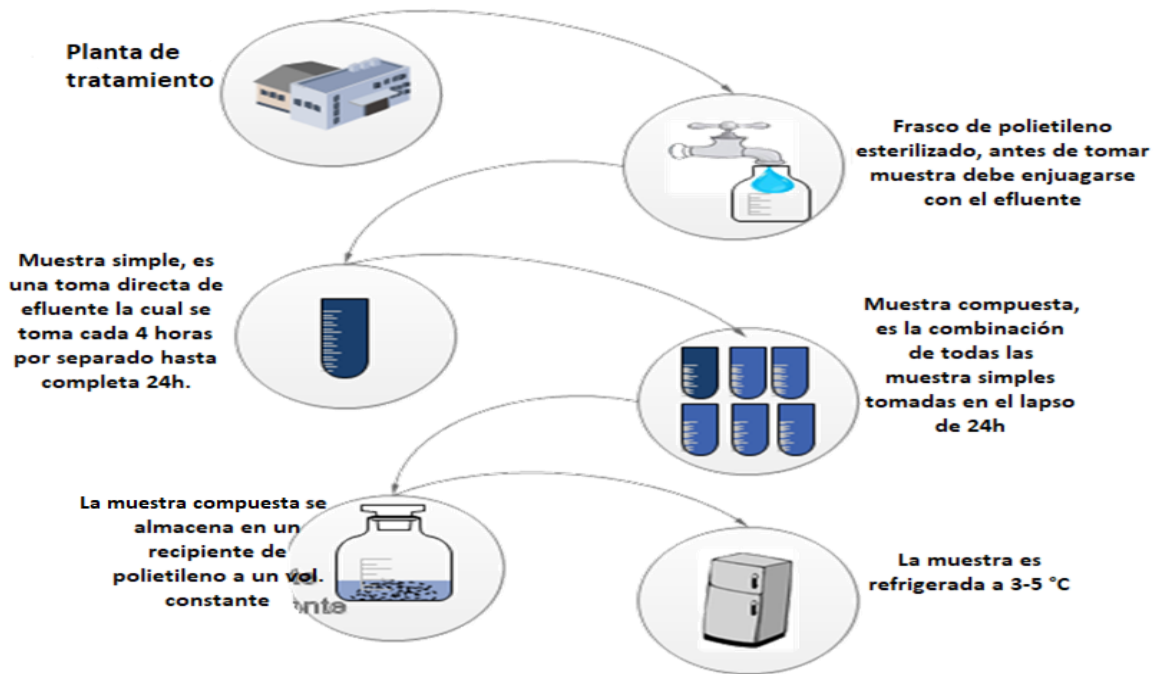


Figura 6. Fase de campo, toma de muestra en PTAR, Fuente: Solís, 2018

8.2 Fase de laboratorio

La fase de laboratorio se llevó a cabo en las instalaciones de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. En la Figura 7 se muestra un esquema con las diferentes etapas que se siguieron para este trabajo, se inició con la caracterización de la muestra con los parámetros iniciales que fueron, DQO, nitrógeno, fósforo, metales pesados, pH, color, turbidez, para posteriormente realizar los ensayos microbiológicos para identificar y cuantificar los microorganismos presentes, se realizó el bioensayo con el alga *C. vulgaris* haciendo un conteo celular diario, durante la experimentación y al finalizar esta etapa se separó la biomasa del agua para ser analizada por separado, se midieron nuevamente los parámetros iniciales y la muestra fue puesta en el fotorreactor *batch* para ser expuesta a fotoxidación por 30 minutos, se midieron parámetros y la muestra tratada, se utilizó

determinar la genotoxicidad con el análisis celular con *Allium sativum* y bioensayos de toxicidad aguda con *Daphnia magna*.

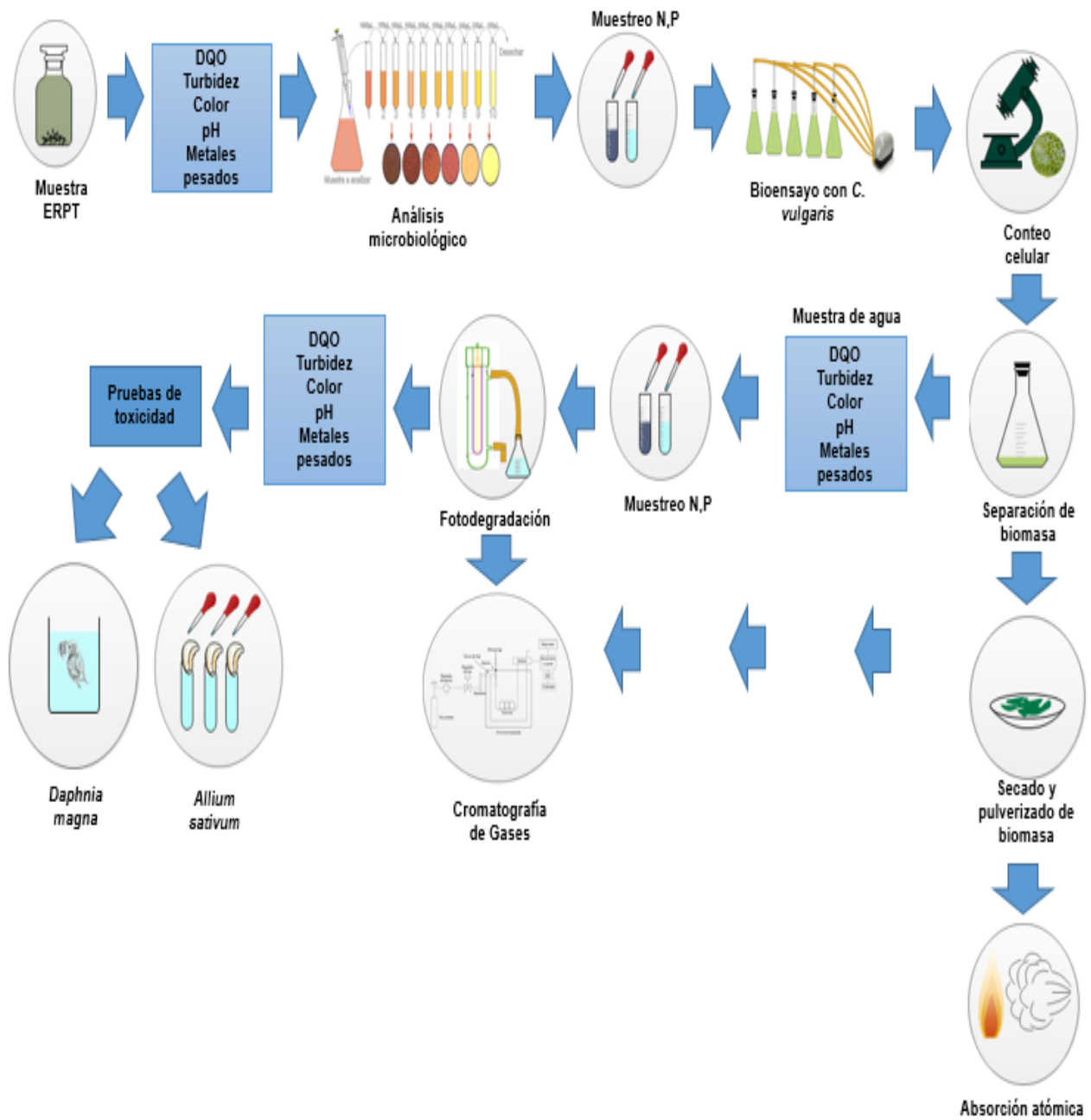


Figura 7. Esquema de las metodologías utilizadas para la realización de este trabajo, Fuente: Solís, 2018.

8.3 Caracterización del agua residual antes y después de tratamiento

DQO: Demanda Química de Oxígeno; se usó el Termorreactor TR320 para digestión de la muestra y luego se analizó la DQO mediante el test en cubetas N°: 14541 del Fotómetro NOVA 60.

COLOR: Para realizar la medición de color, se utilizó un fotómetro Merck modelo SQ-118, con el método 139, que tiene un intervalo de medida de 0.5- 50.0 m⁻¹, para realizar la determinación se colocó una alícuota en una celda de cuarzo de 50 mm de espesor.

TURBIDEZ: Para determinar la medición de turbidez, se utilizó un fotómetro MERCK modelo SQ-118 y el método 113, que tiene un intervalo de medida 10 - 400 UNF (Unidades Nefelométricas de Formazina).

pH: La determinación de pH se llevó a cabo con un medidor de pH CONDUCTRONIC modelo PC-16 portátil. Este se calibró entre 2 unidades de pH con soluciones estándar para garantizar una precisión en las mediciones de ±0.02 pH. El pH de las alícuotas medidas antes y después del tratamiento para poder comparar los resultados.

Los parámetros específicos que se analizaron son el nitrógeno, el fósforo y los metales pesados cobre, plomo, níquel y cadmio debido, en la Tabla 2 se presentan el número de método e intervalos que se utilizó para cada uno de los parámetros mencionados.

Tabla 2. Métodos e intervalos de los parámetros analizados.

Parámetro	Número de método	Método de comparación	Intervalo cubeta de 10 mm
nitrógeno (N)	055	ISO 8466-7, DIN 38405-9	0,5 – 15,0 mg/L de N
fósforo (P)	068	EPA 365.2 +3,	0,05 – 5,00 mg/L de PO ₄ ³⁻ -P
metales pesados:			
cobre (Cu)	027	ISO 8466-1, DIN 38402 A51	0,10 – 6,00 mg/L de Cu
plomo (Pb)	160	ISO 8466-1, DIN 38402 A51	0,10 – 5,00 mg/L de Pb
romo(Cr)	018	ISO 8466-1, DIN 8466-1 A51	0,10 – 5,00 mg/L de Ni
níquel (Ni)	041	ISO 8466-1, DIN 38402 A51	0,05 – 2,50 mg/L de Zn

Dónde: DIN = Métodos Estándar de Alemania. EPA = Environmental Protection Agency, ISO = International Organization for Standardization.

8.4 Ensayos microbiológicos

Se realizó el ensayo microbiológico para identificar algunos microorganismos presentes en la muestra ERPT, permitiendo su cuantificación y caracterización posterior antes y después del tratamiento.

8.4.1 Preparación del caldo nutritivo

El caldo nutritivo BIOXON es un medio líquido en el cual se pueden desarrollar gran variedad de microorganismos que no son muy exigentes en cuanto a sus necesidades nutricionales. Para preparar 100 mL caldo nutritivo es necesario diluir 0.8 g del medio deshidratado en 100 mL de agua destilada, para posteriormente calentar la solución con agitación suave y llevarla a ebullición durante un minuto. La solución se deposita en un frasco estéril y se introduce en autoclave por 15 minutos a 1.02 atmosferas de presión para esterilizar (121 °C). Posteriormente se deja enfriar hasta temperatura ambiente.

8.4.2 Preparación de agar MacConkey

El medio Agar MacConkey de BIOXON se empleó para aislar e identificar selectivamente a enterobacterias como *Salmonella*, *Shigella* y Coliformes a partir de heces fecales, orinas, aguas negras y diversos alimentos. Para prepararlo se pesaron 50 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada, luego se calienta a ebullición agitando con frecuencia, se deja hervir un minuto y se esteriliza en autoclave por 15 minutos a 1.02 atmosferas (121 °C). Posteriormente se deja enfriar a una temperatura entre 45 – 50 °C para verterlo en cajas petri hasta solidificar, es recomendable invertir las cajas una vez que el agar se solidificó para evitar que se deposite un exceso de humedad en la superficie del medio.

8.4.3 Método de diluciones decimales

La preparación de diluciones decimales a partir de una muestra tiene por objeto efectuar disoluciones progresivas de dicha muestra, para poder realizar recuentos microbianos posteriores. Cada muestra para analizar se sometió al método de diluciones decimales, para ello se utilizaron tubos de ensayo estériles con tapa, etiquetados y numerados. En el primer tubo se

vertieron 1000 μL de la muestra utilizando una micropipeta con punta desechable, en los tubos posteriores se vertieron 900 μL de caldo nutritivo utilizando una nueva punta desechable. Se extrajeron 100 μL del primer tubo y se depositaron en el segundo tubo, se agito levemente el contenido del segundo tubo y se extrajeron 100 μL para depositarlos en el tercer tubo y así sucesivamente hasta llegar a depositar 100 μL al último tubo, mismo al que se le restarán 100 μL para desecharlos adecuadamente. Ya que se han hecho todas las diluciones estas se deben incubar en una estufa a una temperatura constante de 37°C durante 24 horas. Todo esto debe realizarse bajo condiciones óptimas de esterilidad para evitar cualquier interferencia en los resultados. Las muestras fueron depositadas en agar nutritivo mediante la técnica de estriado para la cuantificación de las colonias, de igual manera se sembró la muestra en agar MacConkey para la caracterización morfológica Figura 8.

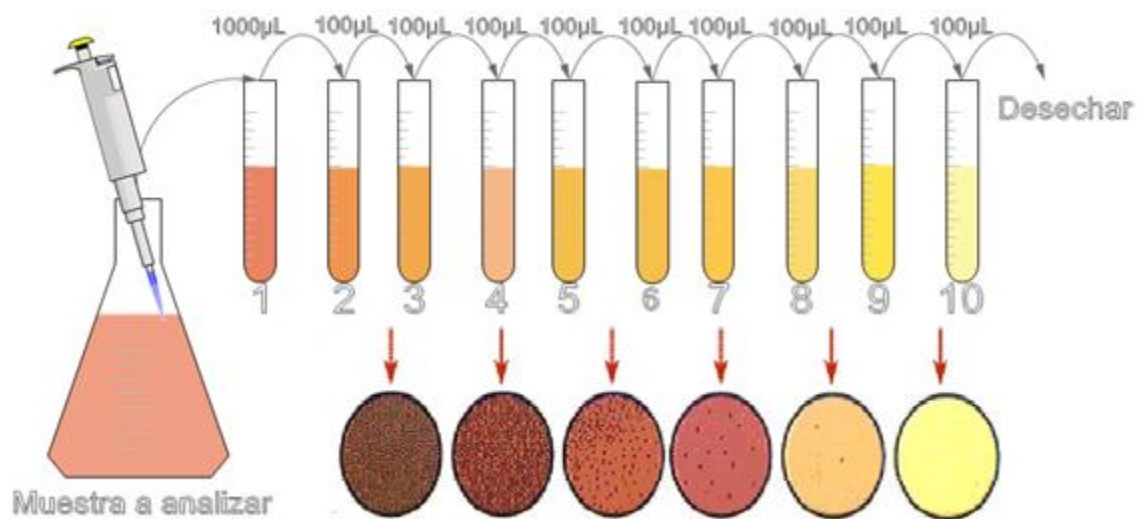


Figura 8. Diluciones decimales, Fuente: Solís, 2018

8.4.4 Identificación con Compact Dry

El medio Compact Dry "Nissui" EC (*E. coli* y coliformes) es un medio compuesto de dos sustratos enzimáticos cromógenos: Magenta-GAL y X-Gluc. Este medio está certificado para su uso por la AOAC (PTM). Para la identificación se adicionó 1mL de la muestra del efluente residual pretratado (ERPT) en el centro de la placa, incubándose a 24 h a 35 °C. De acuerdo con el manual de uso, las

coliformes presentes desarrollan una coloración rojiza, *E. coli* presentó color azul, mientras que las *Pseudomonas* muestran un color café-beige.

8.4.5 Cuantificación de metales por Espectroscopia de absorción atómica

Para la determinación de absorción de metales pesados presentes en la materia orgánica del alga *C. vulgaris*, se realizó un análisis de espectroscopia de absorción atómica mediante un equipo EAA; Spectra 55B Varian, con la siguiente metodología:

Se pesó 1 g de muestra seca la materia orgánica del alga se colocó en un recipiente de digestión de 120 mL.

Se adiciono 0.5 mL de ácido nítrico concentrado y 2 mL de peróxido de hidrógeno a cada recipiente, asegurando que la muestra este completamente humedecida.

Se colocaron los recipientes de digestión en recipientes cerrados para permitir que la muestra y los reactivos se digirieran durante 30 minutos.

Se cerró la válvula de alivio del vaso y se colocó el recipiente en el horno de microondas programado para calentarse en 2 tiempos a) 4 minutos con energía de 296 watts y b) 8 minutos con energía de 565 watts.

Al finalizar el tiempo, se retiró el recipiente del horno de microondas y se colocó en una campana de humos para enfriar. El enfriamiento se realizó mediante ventilación del recipiente con la rotación de media revolución de la válvula, hasta que el recipiente este completamente presurizado. Se retiró la tapa y se enjuaga el tapón del recipiente con agua destilada.

El contenido del recipiente de digestión se colocó en un tubo de centrífuga, diluyendo hasta 15 mL de volumen, tapando el tubo de centrífuga y almacenando.

El análisis elemental de la planta digerida se realizó usando un equipo de Absorción Atómica modelo VarianSpectrAA 55B se colocó la lámpara establecida para el metal a determinar. El equipo se calibró de acuerdo con el manual ajustando la recta a través del capilar que absorbe la solución del metal a determinar para seleccionar la longitud de onda y el ancho de banda espectral.

Se programa el flujo del gas acetileno a 1300 °C.

Se colocó el vaso que contiene la solución en blanco, para realizar la lectura del blanco, se limpia el capilar cada vez que se cambie el vaso y se nebuliza la muestra. La lámpara se cambia de acuerdo con el metal a determinar y se analizó del contenido de cada uno.

8.5 Bioensayo con agua residual pre-tratada

8.5.1 Pruebas con *C. vulgaris*

Se realizaron 5 lotes diferentes a diferentes concentraciones con 4 repeticiones cada uno, a un volumen total de 250 mL donde el lote testigo representa una muestra de agua tridestilada, el rotulo A representa una muestra con un 25:75 en porcentaje con agua tridestilada, el rotulo B corresponde a la muestra con una relación 50:50 en porcentaje con agua tridestilada, el rotulo C es una muestra con 75:25 agua tridestilada y el rotulo D es para la muestra con 100% del efluente residual, se agregó el inóculo del alga *C. vulgaris* a una concentración conocida y 1 g de bicarbonato de sodio por cada litro de muestra como proveedor de carbono, las condiciones de operación fueron las siguientes: aireación constante (proporcionada por bombas ELITE 799 de 19 L/h), a luz continua, con lámparas de luz blanca de tubo de 36w/ modelo 840/ marca PHILIPS, fotoperíodo de 24:0 h, todo esto realizado dentro de una cámara de cultivo a una temperatura de 10°C durante 8 días. Este bioensayo se realizó para observar el comportamiento de *C. vulgaris*, variando las concentraciones del agua, tomando como comparativo el comportamiento en la muestra control (sin medio de cultivo) Figura 9.

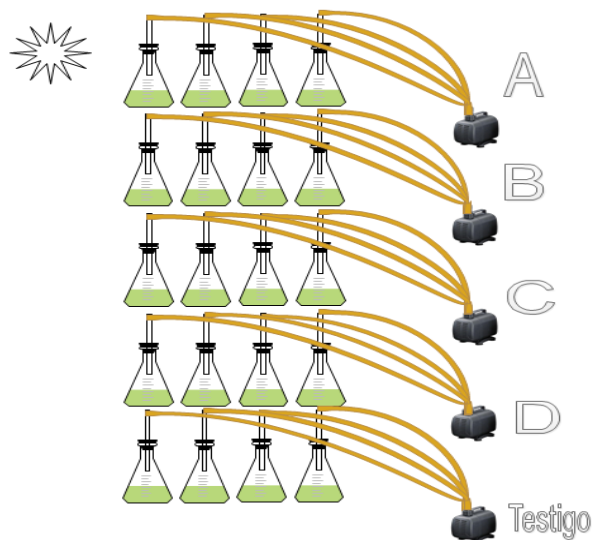


Figura 9. Bioensayo con *C. vulgaris* en disoluciones de ERPT, Fuente: Solís, 2018

Posteriormente al bioensayo con soluciones concentradas, se realizó el ensayo con el efluente residual, se colocaron 5 matraces de 1 L con la muestra, se agregaron 10 mL del inóculo del alga a una concentración de 9.5×10^6 cel/mL y 1 g de bicarbonato de sodio bajo las condiciones antes mencionadas durante 8 días, a partir del agua y la biomasa obtenida en este bioensayo se llevó a cabo la experimentación y el análisis de los resultados en las siguientes etapas de la investigación Figura 10.

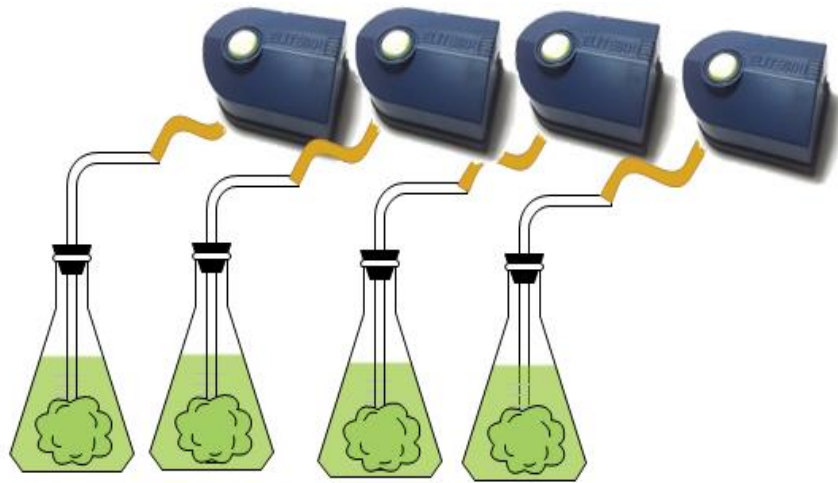


Figura 10. Bioensayo con ERPT al 100%, se analizaron las muestras por cuadruplicado colocando el inóculo de *C. vulgaris* en los matraces con muestra, a condiciones de aireación continua en una cámara de cultivo. Fuente: Solís, 2018

8.5.2 Conteo celular

Se eligió un matraz al azar para muestrear diariamente el crecimiento celular lo largo del ensayo. El crecimiento puede ser estimado por el recuento celular a través del microscopio, este es un método sencillo y poco costoso, el cual permite un mejor seguimiento del cultivo mediante su inspección visual. Uno de los problemas para el recuento al microscopio es obtener una buena repetitividad por lo cual es importante saber seleccionar el tamaño de la muestra, la dilución, el tipo de cámara de recuento, el objetivo del microscopio y la técnica de llenado de la cámara, la metodología se explica a continuación.

8.5.3 Preparación de la muestra:

Dependiendo del tipo de muestra a medir, se preparó una muestra con una concentración apta para su recuento. La muestra debe tener una concentración en torno a 10^6 (1 millón) aplicando las diluciones correspondientes por debajo de 250.000 células / mL ($2.5 * 10^5$) la cantidad de células contadas no es suficiente para poder dar una estimación lo suficientemente fiable de la concentración celular.

8.5.4 Introducción de la muestra en la cámara de Neubauer:

- Se calibró la micropipeta con la cantidad a muestrear (10 μ L)
- Se retiró la punta de la pipeta de la muestra, manteniéndola en posición vertical hasta llevar a la cámara de Neubauer.
- Se colocó la punta de la pipeta en el extremo de la cámara de Neubauer la muestra fue depositada la ranura de la cámara.
- Se suelta el pistón suavemente verificando que el líquido está entrando correctamente y de forma uniforme en la cámara.
- Una vez cargado el volumen de la cámara se colocó el cubreobjetos en caso de que aparezcan burbujas o el cubreobjetos se haya movido, es necesario repetir la operación hasta tener la cámara de Neubauer cargada, lista para el recuento celular.

8.5.5 Preparación y enfoque del microscopio.

- Se colocó la cámara de Neubauer en la bandeja del microscopio
- Se enfocó el microscopio hasta que la imagen de las células se observara nítida a través del binocular.
- Se buscó el primer cuadro donde se realizó el recuento. En este ejemplo se cuentan 5 cuadros grandes de una cámara de Neubauer Improved de 0,1mm.
- Se realizó el recuento de células en el primer cuadro. Existe una convención que establece que: si las células tocan el límite superior o el límite izquierdo del cuadro, deben contabilizarse, pero no se contabilizan si tocan el límite inferior o el límite derecho.
- Se registró la cantidad de células cuantificadas en el primer cuadro.

- Se repitió el proceso para el resto de los cuadros que se desea contar, anotando el resultado de cada uno de ellos. Cuantos más cuadros se cuantifiquen, más precisión se obtendrá en nuestra medida.

8.5.6 Cálculo de la concentración

Se aplica la fórmula del cálculo de concentración celular para obtener el número de células por mL.

$$\text{Concentración } \left(\frac{\text{cel}}{\text{mL}}\right) = \frac{\text{número de células}}{\text{Volumen}}$$

El número de células = suma de todas las células contadas en todos los cuadros.

El volumen = volumen total de todos los cuadros donde se hará el recuento.

La fórmula para recuento con cuadros grandes en cámara de Neubauer.

$$\text{Concentración } \left(\frac{\text{cel}}{\text{mL}}\right) = \frac{\text{número de células} \times 10000}{\text{número de cuadros}}$$

En el caso de que se utilice una dilución, se debe transformar la concentración obtenida durante el recuento celular en la concentración de la muestra original. La fórmula quedará:

$$\text{Concentración } \left(\frac{\text{cel}}{\text{mL}}\right) = \frac{\text{número de células} \times 10000}{\text{número de cuadros} \times \text{dilución}}$$

8.6 Fotodegradación

Posteriormente al tratamiento con el *C. vulgaris*, el agua residual se sometió a un tratamiento de fotodegradación, se empleó un fotorreactor *batch* de vidrio PIREX, de 850 mL de capacidad acoplado a una lámpara de mercurio de presión media modelo PUV-1022, Heraeus, Frankfurt, Alemania, de 11 cm de longitud de arco, tensión de 145 volts y corriente de 7.5 amperes, con cubierta de cuarzo con una emisión de 200 a 460 nm, acompañado de suministro de oxígeno y

recirculador de agua; con una entrada donde se adicionó $3.5 \cdot 10^{-7}$ mol/L de H_2O_2 , 0.018 mol/min O_2 , se hizo pasar el agua tratada biológicamente durante 30 minutos y se tomaron muestras cada 5 min. Para medir la absorbancia por medio de Espectrofotómetro UV-vis marca Perkin Elmer modelo lambda 20, sumado a la continua evaluación de los parámetros concentración de los contaminantes orgánicos, DBO, DQO, turbidez, color, repitiendo cada experimento dos veces por cada muestra mensual que se analizaba. La potencia de la lámpara empleada en el tratamiento fotoquímico es de 1000 W, la cual tiene una eficiencia de esterilización del 100% de la carga microbiana después del contacto.

8.7 Cromatografía de gases

8.7.1 Extracción liquido-liquido

Se analizaron la muestra con el efluente residual, la muestra tratadas con biorremediación *con C. vulgaris*, la muestra tratadas con biorremediación complementadas con el tratamiento fotoquímico, y la biomasa de *C. vulgaris*, con los solventes hexano y cloroformo para las muestras de agua y hexano y etanol para la biomasa, dando un total de 8 muestras. La extracción se realizó con un embudo de separación, equipado con un tapón y una llave que ajuste y gire de manera adecuada para evitar la pérdida de muestra. Antes de realizar la adición de cualquier sustancia, el embudo debe colocarse sobre un aro metálico unido a un soporte, colocando un vaso de precipitados debajo del embudo.

Asegurándose que la llave de desfogue está cerrada completamente cerrada, con un embudo cónico, se adicionó 1L de la muestra junto con 5 mL del solvente, para posteriormente agitar vigorosamente por 5 minutos y evitando la acumulación de gases se colocó el embudo en el aro, se quita el tapón hasta que las fases se separen por completo y se observe la línea de separación Figura 11. La fase orgánica se filtró con sulfato sódico anhidro en papel filtro montado en un embudo cónico, se lava con el mismo solvente para evitar pérdidas del producto, esto con el fin de eliminar el agua contenida, y se concentró a presión reducida en el rotavapor. Posteriormente la muestra concentrada se colocó en un vial de 2 mL para ser analizada mediante cromatografía de gases acoplado a masas.



Figura 11. Extracción de compuestos orgánicos con hexano y cloroformo.

8.7.2 Análisis con Cromatografía de gases acoplada a masas

Posteriormente a la extracción líquido-líquido (ELL), el extracto obtenido se llevó al análisis por cromatografía de gases acoplado a masas, el cual se realizó utilizando un cromatógrafo de gases 7890 Agilent Technologies, acoplado a un espectrómetro de masas 5975 (CG-MS), se inyectó 1 μL de cada uno de los 8 extractos bajo las siguientes condiciones cromatográficas: columna DB-5MS de 0.5 μm *30m*0.25 μm DI, temperatura del inyector 180°C, temperatura del detector 220°C, con una rampa que inicia 56°C/1min, 10°C/1min, 196°C/1min, 20°C/1min, 260°C/5min., Inyector en modo Split/spitless. Posteriormente al análisis de las muestras se obtuvo un cromatograma con los compuestos contenidos en cada muestra analizados con los diferentes solventes hexano y cloroformo posteriormente se hizo un comparativo con la biblioteca contenida en el equipo de acuerdo los picos cromatógrafos, las áreas bajo la curva, y el tiempo de retención junto con el nombre del compuesto complementando la información de los compuestos con la base de datos NIST08, investigando su procedencia y uso así como su toxicidad. Los compuestos que presentaron un porcentaje mayor al 50 % fueron concentrados en una tabla para cada muestra tratada con cada solvente.

8.8 Análisis de toxicidad

Se realizaron dos ensayos diferentes para evaluar la toxicidad y genotoxicidad, en estos análisis fue utilizado *Allium sativum* (ajo) y por medio de la prueba de toxicidad aguda con *Daphnia*

magna, como bioindicadores, esta se realizó como lo indica la norma oficial mexicana: NMX-AA-087-SCFI-2010 a continuación, se señala la metodología que se aplicó para cada ensayo.

8.8.1 *Allium sativum*

Se realizó un ensayo para determinar de toxicidad y genotoxicidad en plantas de ajo. Los ajos analizados fueron comprados en un mercado de la ciudad de Puebla, posteriormente se removió la cascara cuidando no causarles ningún daño o rasgadura, a partir de estos ajos se hizo una selección tomando los ajos con peso a aproximado de 1g y que no contaran con lesiones, como paso siguiente los ajos fueron puestos a hidratar durante 30 minutos antes de ser montados.

Con el ERPT y con el agua obtenida del tratamiento con *C. vulgaris* complementado con fotoquímica, se realizaron 6 diluciones de 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50 y 100 % con 5 repeticiones cada uno, junto con un control negativo el cual fue agua purificada tomando 70 bulbos de ajo homogéneos de apariencia sana para ser colocados en tubos de ensaye con las soluciones antes mencionadas teniendo cuidado de que la punta del ajo quede hacia arriba y la parte basal este en contacto con el agua, se colocó a enraizamiento en condiciones de oscuridad durante 24 horas. A las 48 horas se midió la longitud de las raíces de cada bulbo de ajo a la misma hora, y se irrigaron con las soluciones correspondientes, ya que había una absorción estimulada por el crecimiento de las raíces. Después de 120 horas, se procedió a cortar las raíces, se fijó de manera separada en etanol: ácido acético glacial (3:1 v/v) durante 24 horas, posteriormente se sometió a hidrolisis (HCl 1N a 60 °C) durante 5 minutos y después se lavaron con agua destilada, para ser colocadas en portaobjetos y realizar la tinción celular con azul de metileno. Finalmente se observaron al microscopio en aumento de 100x y se tomaron microfotografías. Se registró el coeficiente de inhibición de la raíz, índice mitótico, tasa y tipo de aberraciones.

Para el análisis comparativo entre ERPT y el agua tratada se realizó la prueba de Kruskal-Wallis y su comparación múltiple de Dunns, con un nivel de significancia de 0.05. Y para el comparativo de la influencia en Índice mitótico (IM) se utilizó un análisis de varianza con su comparación múltiple de Tukey con un nivel de significancia de 0.05.

Para evaluar la toxicidad se determinaron los siguientes indicadores:

Se calculó el coeficiente de inhibición del crecimiento de las raíces, utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Coeficiente de inhibición} = \frac{\text{Longitud del control} - \text{longitud de tratamiento}}{\text{longitud control}} \times 100$$

También se evaluó el índice mitótico, la inhibición mitótica y la frecuencia de células anómalas:

$$\text{inhibición mitótica} = \frac{\text{índice mitótico del control} - \text{índice mitótico del tratamiento}}{\text{índice mitótico del control}} \times 100$$

$$\text{Frecuencia de células anómalas} = \frac{\text{N}^\circ \text{ células anormales}}{\text{Total de células contadas}} \times 100$$

8.8.2 *Daphnia magna*

Inicialmente se realizó una prueba exploratoria como la marca la NMX-AA-087-SCFI-2010[41], la prueba exploratoria es de utilidad tanto para discriminar entre muestras tóxicas de muestras inocuas, así como para determinar si el intervalo de concentraciones o diluciones que se deben aplicar para la determinación de la CE₅₀ de una muestra en una prueba definitiva. Se prepararon diluciones de la muestra. Se sugiere considerar por lo menos 5 concentraciones o diluciones, tomando una escala logarítmica como son al 100 %, 10 % y 1 % etc. o empleando cualquier otro factor de dilución. En esta prueba, hay que considerar el análisis de los controles positivo y negativo

Para este análisis exploratorio de *Daphnia magna*, se colocaron 100 mL de diluciones al 100%, 75% y 50% de las muestras ERPT, tratamiento con *C. vulgaris* complementado a fotodegradación y una solución testigo (agua destilada), se transfirieron 2 neonatos en cada una de las muestras. Terminada la transferencia, se cubrieron los vasos con parafilm y se colocaron bajo condiciones controladas de iluminación y temperatura (20 °C) por un período de 48 horas. Transcurridas 24 horas se realizó la lectura preliminar de los resultados, observando el número de individuos vivos

y muertos en cada dilución y en el testigo. Transcurrido el tiempo establecido, se revisaron las muestras y se registró el número de organismos muertos en cada uno.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos de los tratamientos aplicados al efluente residual y los datos del número de aberraciones presentes en las raíces se analizaron con la prueba de ANOVA y su prueba múltiple de Tukey con un nivel de confianza de 95% (Software IBM SPSS).

IX RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados y su discusión se han separado de acuerdo con el esquema mostrado en la metodología, iniciando la caracterización del efluente de la planta con los parámetros antes mencionados, posteriormente se realizó un bioensayo del agua residual para observar el comportamiento de *C. vulgaris* en este tipo de agua ya que en algunos casos la mezcla compuesta de contaminantes inhibe el crecimiento del alga. Al finalizar el bioensayo con el agua residual a diferentes concentraciones (25, 50, 75 y 100%) se realizó un conteo celular a todas las muestras junto con sus repeticiones y se calculó un promedio de la densidad celular de cada una. En la Tabla 3 se observan los datos del crecimiento exponencial celular, en donde se observa que a una mayor concentración de agua residual aumento la densidad celular, lo cual puede asociarse a la metabolización de los nutrientes por parte del alga, utilizándolos para alimentarse y reproducirse, en el caso del testigo que fue agua destilada sin ningún medio de cultivo, no existió un crecimiento celular, por el contrario el alga inoculada se tornó de un color amarillento y durante el conteo celular estas presentaron mortalidad. Con esto se confirmó que el agua obtenida de la planta contaba con las características adecuadas para la sobrevivencia y crecimiento de *C. vulgaris*

Tabla 3. Densidad celular promedio en c/mL obtenida por cada solución del efluente

Soluciones (%)	Células de <i>C. vulgaris</i> (cel/mL)
100	139.96
75	55.71
50	19.23
25	12.29
0 (Testigo)	10

En este ensayo de prueba *C. vulgaris* presentó metabolización tanto de nitrógeno y fósforo, absorción de níquel y plomo que fueron los metales que presentaron una mayor disminución en comparación a las concentraciones iniciales. En algunos casos la presencia de metales se hizo visible como en el testigo, *C. vulgaris*, al encontrarse en condiciones hostiles y sin tener suficientes nutrientes para alimentarse comienza a sufrir un proceso de osmosis inversa en la pared celular, por lo que los nutrientes son expulsados al ambiente que la rodea es importante mencionar que los metales pesado de sistema acuáticos contaminados pueden ser removidos por algas fitoplactónicas. La pared celular de algas presenta carbohidratos como pectinas, xilanas, mananas y ácido alginico, además de lípidos y proteínas los cuales proveen sitios ligantes de iones metálicos. Estos compuestos crean un área de afinidad para cationes metálicos monovalentes[42]. De estos resultados también se observa que en la experimentación con los 5 diferentes bioensayos, las soluciones al 75 y al 100% fueron las que presentaron una mayor metabolización de nitrógeno, fósforo y absorción de metales pesados, esto relacionado a las características del agua como medio adecuado para el crecimiento del alga, la muestra que contenía 100% del agua residual mostró una disminución de un 75% en el contenido de fósforo y un 95% de nitrógeno total después del tratamiento

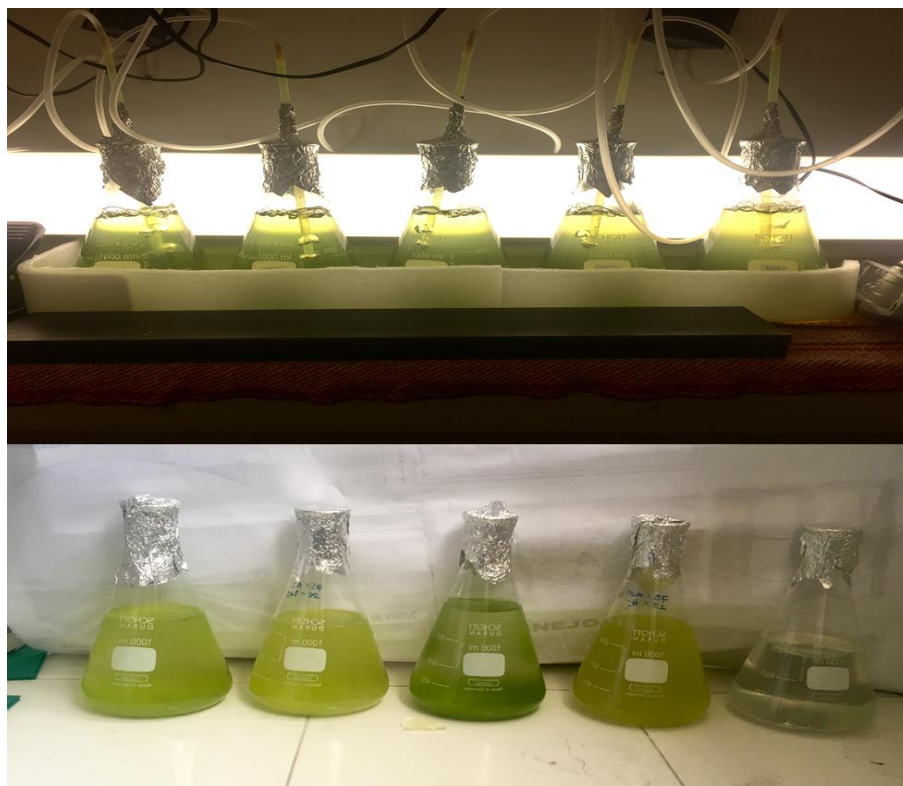


Imagen 1. (Arriba) Bioensayo con *C. vulgaris* en cámara de cultivo, (abajo) muestras posteriores a bioensayo

Posteriormente se realizó un bioensayo donde se colocó el *C. vulgaris* en ERPT al 100% como medio de cultivo como se muestra en la Imagen 1, se colocaron 5 matraces de 1L del efluente con un 10 mL de inóculo del alga concentrada en las condiciones antes mencionadas durante 8 días realizando un conteo celular diario de una muestra representativa por triplicado, para cuantificar el aumento de la biomasa a lo largo del ensayo, se puede ver el aumento del número de células a medida que aumenta el tiempo del ensayo, un indicativo de esto es el aumento en la biomasa en el último día del bioensayo, el comportamiento es similar en cada una de las repeticiones, por lo que el ensayo es reproducible. De acuerdo a los resultados, el comportamiento del conteo celular por día es similar al reportado en la bibliografía, en ocasiones para facilitar el aumento del conteo celular, se aplica un campo magnético estático, aunque el control coincide con lo observado en la presente investigación[43], otros investigadores realizaron sus investigaciones por más tiempo[44], e incluso hay cálculos de cinéticas de crecimiento [45], se observa como con el aumento de los días hay un aumento en la carga celular, asociado a la absorción de nutrientes presentes en el efluente residual como se muestra en la Figura 12.

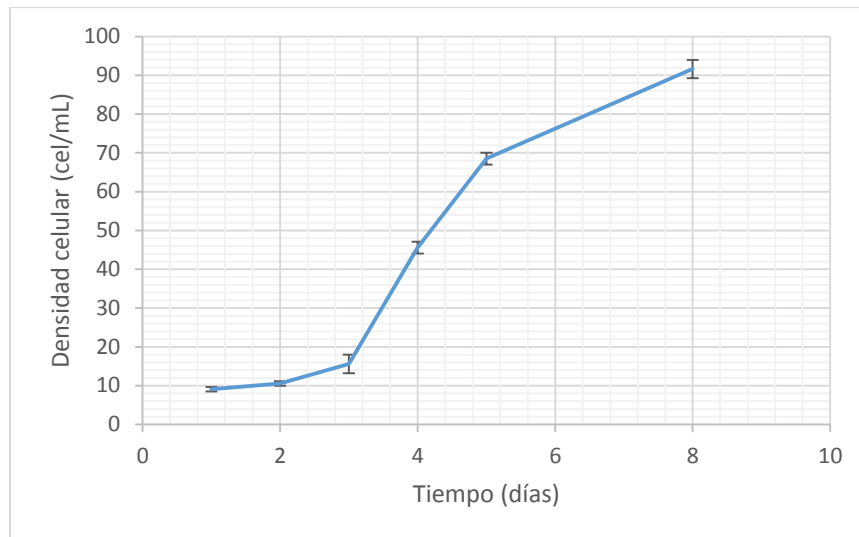


Figura 12. Evolución del crecimiento celular de *C. vulgaris* con forme aumentan los días.

También se evaluó la absorción de fósforo diariamente para observar el comportamiento de la metabolización del nutriente, esta determinación se realizó por duplicado, se observa que conforme transita el tiempo se observa la disminución de fósforo, al finalizar el ensayo presentó una disminución de más del 50%, los resultados obtenidos se presentan la Figura 13 se muestra la curva de eliminación del fósforo total disuelto en el efluente residual se observó un rápido consumo de fósforo durante los primeros dos días, el cual se relaciona directamente con el incremento en la biomasa.

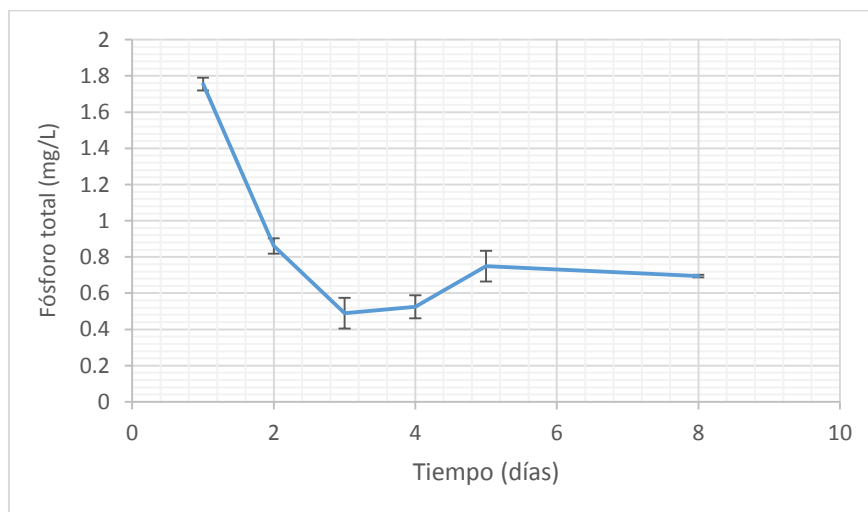


Figura 13. Absorción de fósforo total con *C. vulgaris*.

9.1 Fotodegradación

Posteriormente al tratamiento con el alga *C. vulgaris* el agua libre de materia orgánica se colocó en el fotorreactor equipado con una lámpara UV y se $3.5 \cdot 10^{-7}$ mol/L de H_2O_2 al 50% (Figura 14).



Figura 14. Fotorreactor con muestra agua residual/alga, Fuente: Solís, 2018

Durante la degradación con el sistema UV/ H_2O_2 , se tomaron muestras cada 5 minutos para medir la absorbancia, mediante espectrofotometría UV-Vis en la Figura 15 se presentan los espectros de absorción UV-VIS donde aparecen en color rojo representando al efluente de la planta de tratamiento (EPT), después de 5 minutos de tratamiento se observa una disminución del área bajo el espectro y debido a que el área se relaciona con la concentración por la ley de Lambert-Beer, que es la relación entre la absorbancia y la concentración de especies absorbentes en una región determinada, al disminuir el área bajo el espectro disminuye la concentración de los contaminantes orgánicos que absorben en esa región. Lo mismo se observa en los siguientes periodos de irradiación. A medida que pasa el tiempo de irradiación se puede notar la reducción de las áreas en los espectros, debido a la transformación química de los compuestos orgánicos, después de 30 minutos se obtuvo el espectro de color morado, en la gráfica también puede observarse el espectro color cyan obtenido utilizando agua potable, este espectro es un punto de referencia para la comparación con el agua residual tratada con *C. vulgaris* y tratamiento fotoquímico también se observa que después de 10 minutos de irradiación, no hubo disminución

del área de los espectros determinados en mayores tiempos de irradiación, por lo que se puede deducir que 10 minutos de irradiación es el tiempo idóneo para tratar fotoquímicamente este tipo de agua. La característica selectiva del peróxido de hidrógeno contribuye a ser utilizado en diferentes aplicaciones.

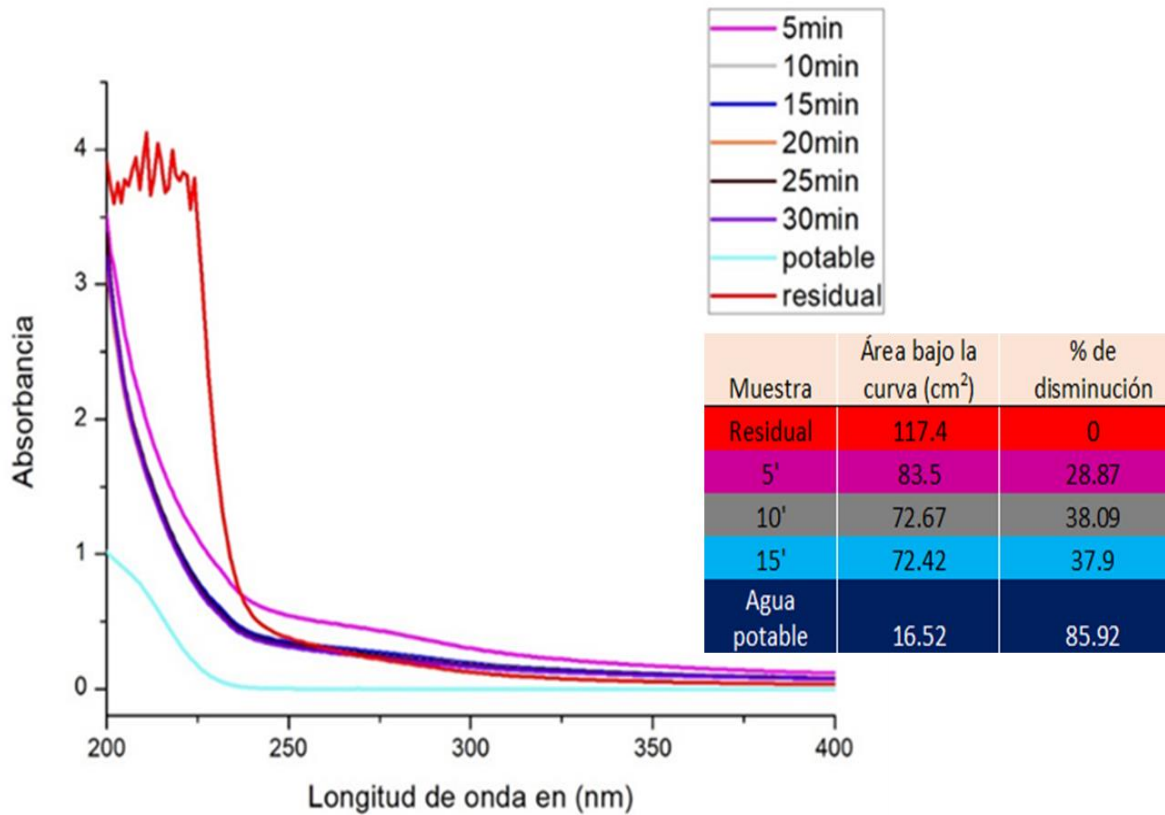


Figura 15. Espectros UV-Vis de Efluente residual tratado con *C. vulgaris*, Fuente: Solís, 2018

Ajustando algunos parámetros como el pH, temperatura, dosis, tiempo de reacción, adición de catalizadores, el H₂O₂ puede oxidar compuestos orgánicos complejos en compuestos menores, menos tóxicos y más biodegradables, razones para convertir esta aplicación en una solución atractiva para tratamiento [46]. El uso de UV/peróxido ofrece ventajas ya que el H₂O₂ es un oxidante comercial muy accesible, es térmicamente estable y de fácil almacenamiento [47].

9.2 Caracterización

Los parámetros generales se midieron después de haber realizado el bioensayo con *C. vulgaris* y posterior al tratamiento fotoquímico, en la Tabla 4 se hace un comparativo de los resultados

obtenidos en cada etapa, como se muestra hubo un cambio de coloración después de usar el alga, esto por la presencia de algunos pigmentos residuales del alga presentes en el agua, posterior al tratamiento fotoquímico la muestra presentó mayor claridad, debido a la interacción de la luz UV con la materia orgánica la cual es capaz de ser degradada [48]. En las dos etapas hubo una disminución en cuanto a la DQO para finalizar con 160 mg/L. Los resultados más interesantes se presentan en el nitrógeno y el fósforo, posteriormente al tratamiento con *C. vulgaris* hubo una disminución del 91.38% para el nitrógeno y del 75.1% del fósforo, en el caso de los metales, cadmio, plomo, y níquel antes del tratamiento se encontraban por arriba de los estándares de la NOM-001-SEMARNAT-1996, posterior al tratamiento con *C. vulgaris* complementado a fotodegradación, cadmio disminuyó un 48%, mientras que níquel un 93.3%, ambos parámetros quedaron por debajo del estándar de la norma. En el caso del plomo el resultado obtenido fue de 0.76 mg/L, mostrando una disminución de un 20% quedando aun por arriba a lo marcado en la NOM 001 (1 mg/L).

Tabla 4. Caracterización del agua en diferentes etapas.

Parámetros	Muestra pretratada	NOM 002	NOM 001		Posterior a tratamiento con <i>C. vulgaris</i>	Posterior a tratamiento con fotodegradación	Porcentajes de remoción
			Uso en riego agrícola (A)	Protección de vida acuática (C)			
DQO (mg/L)	300	-	-	-	220	150	50
DBO (mg/L)	245	-	200	60	-	62	74.7
Turbidez (UNF)	7	-	-	-	39	2	71.4
Color (°/m)	8.71	-	-	-	9	1	87.1
pH	8	5 – 10	5 – 10	5 – 10	7	7	7
Materia flotante (mg/L)	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	Ausente
Cadmio (mg/L)	0.205	0.5	0.2	0.1	0.182	0.182	11.2
Cobre (mg/L)	0.05	10	4	4	< 0.05	< 0.05	-
Níquel (mg/L)	3.93	4	2	2	2.01	0.26	93.38
Plomo (mg/L)	0.76	1	0.5	0.2	0.67	0.67	11.8
Nitrogeno Total(mg/L)	19.7	-	40	15	< 0.5	< 0.5	97.4
Fósforo Total (mg/L)	4.21	-	20	5	1.05	0.95	77.4
tetracloroetileno	presente	-	-	-	presente	presente	Presente
ftalato de dibutilo	presente	-	-	-	presente	presente	Presente

Para comprobar que los datos que se obtuvieron no presentaban variación, la muestra compuesta en la planta de tratamiento se recolectó cada mes repitiendo la experimentación a lo largo de 4 meses de septiembre a febrero, los datos obtenidos durante la experimentación se muestran en la Tabla 55, donde también se evalúan los datos obtenidos posteriores al tratamiento con *C. vulgaris* y la fotodegradación, se puede apreciar que los datos presentan repetitividad, por lo que se puede argumentar que esta metodología es reproducible y no presenta variación en el comportamiento a pesar de tratarse de una mezcla compleja, obtenida en diferentes meses.

Cabe mencionar que en el último ensayo se realizó el análisis todas las 5 repeticiones rotuladas como M1, M2, M3, M4, M5 en la parte derecha de color azul en la Tabla 5 se muestran estos datos, esto se realizó para obtener la mayor cantidad de materia orgánica (Biomasa) y medir los metales pesados presentes en el agua que absorbió el alga y para analizar el comportamiento en cada repetición. Se nota como la mayoría de los datos presentan poca variabilidad, por lo que puede ser un experimento reproducible y representativo, fósforo y níquel mostraron leves aumentos en algunas de sus muestras, se incorporan aguas de uso doméstico, industrial, agrario entre otros, que vienen de diferentes puntos de la ciudad para ser tratadas en la planta, por lo que es comprensible que las muestras presenten variaciones a lo largo de los meses, a pesar de estos factores las muestras analizadas mostraron comportamientos similares y con poca variación.

Tabla 5. Caracterización de muestra significativa del agua en los diferentes ensayos realizados mensualmente, análisis significativo de todas las muestras.

Parámetros	Límites permisibles NOM 003	Resultados obtenidos en repeticiones							(repeticiones) de tratamiento				
		ERPT	alga-foto	ERPT	alga-foto	ERPT	alga-foto	ERPT	alga-foto (M1)	M2	M3	M4	M5
Nitrógeno mg/L	15	19.7	0.5	19.7	1.77	22.1	0.5	23	2.6	-	-	-	-
Fósforo mg/L	5	4.21	0.95	4.21	1.7	1.25	0.3	1.6	0.7	-	-	-	-
Cobre mg/L	4	0.05	0.05	0.16	0.06	0.18	0.04	0.24	0.02	0.03	0.06	0.02	0.025
Cadmio mg/l	0.1	0.76	0.67	0.028	0.02	0.045	0.026	0.06	0.03	0.025	0.008	0.025	0.025
Plomo mg/L	0.2*	0.21	0.182	0.76	0.67	0.8	0.36	1.06	0.41	0.48	0.31	0.35	0.31
Níquel mg/L	2*	3.93	0.26	0.77	0.3	2.92	0.26	5.6	0.36	0.37	0.3	0.28	0.24

*Por debajo del límite

9.3 Biomasa

La biomasa obtenida de los bioensayos con *C. vulgaris*, fue secada y pulverizada, posteriormente analizada mediante absorción atómica para determinar el contenido de metales pesados (Tabla 6), la biomasa presentó valores superiores a los parámetros determinados en el agua, ya que son elementos esenciales para su crecimiento, el plomo presentó resultados relevantes por ser un elemento estudiado por su toxicidad, se observó la absorción de Plomo en un 30 % aproximadamente en comparación con la muestra inicial, para el Cobre y el Níquel hubo una absorción mayor al 50 %, el Cadmio fue el elemento con una absorción del 4.28 %, con esto se demostró cómo el bioensayo con *C. vulgaris* presenta efectividad para la remoción de metales pesados.

Tabla 6. Caracterización de metales pesados determinados en biomasa de *C. vulgaris*.

Muestra	Pb(mg/L)	Cu(mg/L)	Cd(mg/L)	Ni(mg/L)
Testigo	0.06	0.324	0	5
ERPT	1.06	0.24	0.058	3.6
M1	0.42	0.316	0.0047	1
M2	0.4	0.296	0.0033	4
M3	0.35	0.136	0.0033	7
M4	0.2	0.046	0.0014	4
M5	0.31	0.156	0.0022	2
AT	0.372	0.031	0.0226	0.31
Promedio	0.44	0.17	0.01	3.13
Porcentaje absorbido por el alga	32.36%	65.9%	4.28%	83.3%

9.4 Análisis microbiológico del efluente residual

Se llevó a cabo una serie de 6 diluciones decimales junto con la muestra EPT inoculadas en caldo nutritivo, las muestras se incubaron en una estufa a 37°C durante 24 h, posterior a este lapso de

tiempo presentaron turbidez característica de la actividad microbiana en las muestras 0, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 tal y como se muestra la Imagen 2 la ausencia de turbidez no garantiza que no haya desarrollo bacteriano, por lo que se debe comprobar haciendo una siembra en placa por estriado.

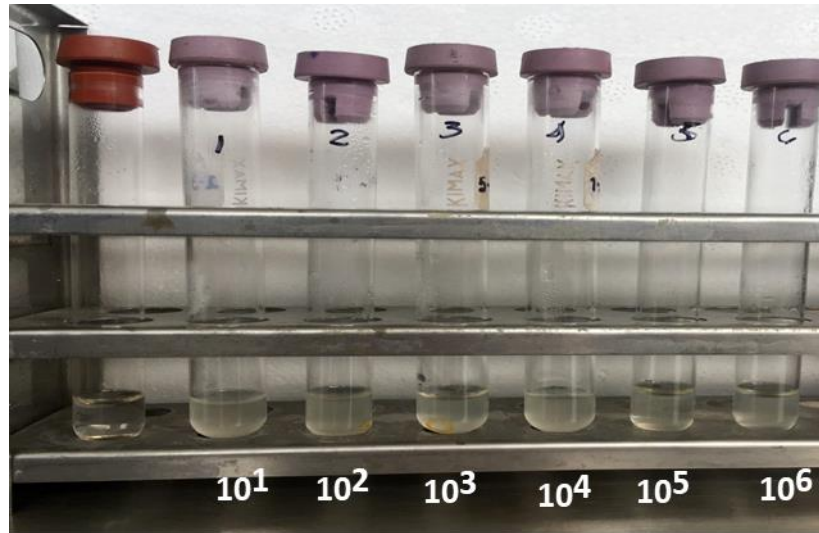


Imagen 2. Disoluciones del agua residual en caldo nutritivo, Fuente: Solís, 2018

Las muestras obtenidas del caldo nutritivo se sembraron por estría en agar nutritivo a 37 °C incubando durante 24 horas, para cuantificar las colonias (UFC), únicamente se contabilizaron las colonias que presentaron mayor separación y forma como se muestra en la Imagen 3, se contaron 58 colonias en la placa inoculada con agua del efluente residual pretratado y para las diluciones 10^5 y 10^6 colocadas en las placas con el rotulo Res5, Res6 se contaron 364 y 215 colonias respectivamente Imagen 4.

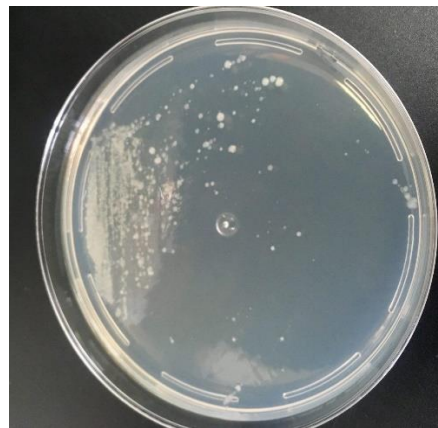


Imagen 3. ERPT sembrada en agar Nutritivo, Fuente: Solís, 2018



Imagen 4. Diluciones en Agar Nutritivo Res1 (10^1) más concentrada a Res6 (10^6) menos concentrada Fuente: Solís, 2018

El agua residual inoculado en caldo nutritivo, se sembró en agar MacConkey (Imagen 5), de igual manera las diluciones se sembraron en las placas rotuladas como A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7 de agar MacConkey (Imagen 6), se utilizó para identificar algunas colonias dando lugar al crecimiento de enterobacterias, como *Salmonella*, *Shigella* y *E. coli*.

Las colonias en las placas se identificaron y aislaron las 10 más representativas y posteriormente se consultó el manual Bioxon en el que se encontraron las interpretaciones para caracterizar cada colonia de acuerdo con su tamaño, color y textura.



Imagen 5. Microorganismos presentes en el agua del efluente pretratado sembrada en agar MacConkey, Fuente: Solís, 2018

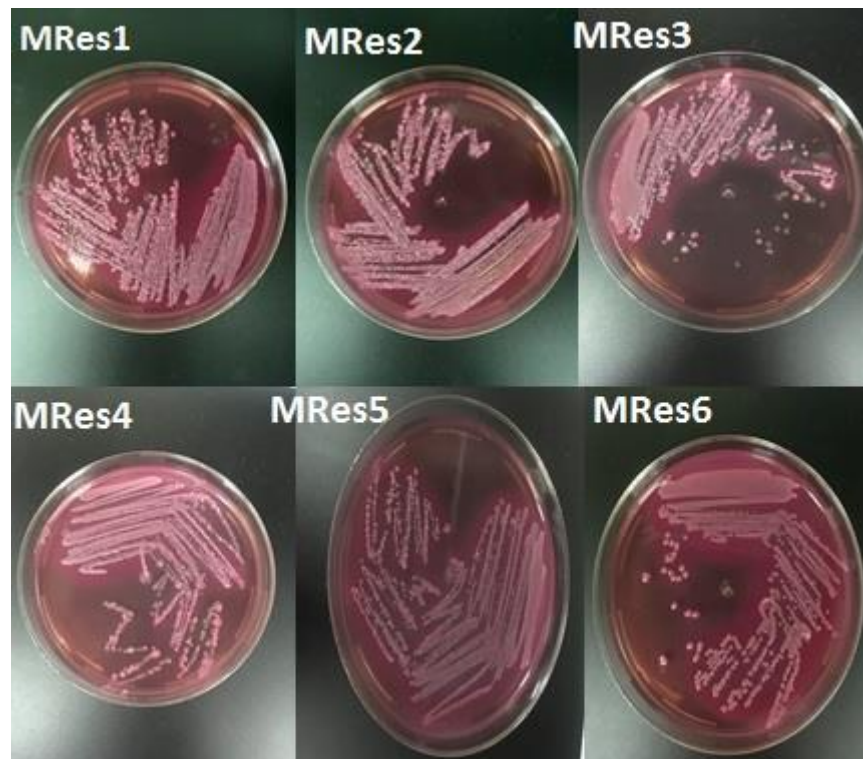


Imagen 6. Colonias de microorganismos determinadas en diluciones, sembradas en agar MacConkey, Fuente: Solís, 2018

Escherichia coli , un anaerobio facultativo gramnegativo común aunque *E. coli* se ha utilizado como un indicador de la calidad del agua de la contaminación fecal durante años, varios estudios han encontrado que *E. coli* puede crecer fuera del tracto gastrointestinal de sus huéspedes animales en ambientes tropicales y subtropicales[49] Actualmente se carece de herramientas

fiables de seguimiento de fuentes microbianas (MST) para analizar rápidamente muestras de agua en busca de marcadores múltiples de contaminación fecal, el medio ambiente acuático proporciona un entorno ideal para la adquisición y diseminación de resistencia a los antibióticos [50] Los cuerpos de agua naturales, generalmente son utilizados para el riego, la acuicultura o las actividades de recreación, relacionados estrechamente relacionados con las actividades humanas. El contacto directo o indirecto con agua (para beber o uso recreativo) podría dañar e infectar a la población humana con patógenos resistentes a antibióticos.

Salmonella spp. son importantes bacilos gramnegativos, que infectan a humanos y animales y causan una amplia gama de enfermedades como gastroenteritis, fiebre tifoidea, osteomielitis, septicemia y meningitis [51,52] se ha encontrado que los efluentes tratados siguen siendo una fuente importante de contaminación de los ríos con agentes patógenos como *Salmonella* . Se necesitan pasos apropiados por parte de las autoridades reguladoras y los trabajadores en las plantas de tratamiento para hacer cumplir las pautas estipuladas a fin de prevenir la contaminación de los recursos hídricos superficiales debido a la descarga de efluentes mal tratados [53].

Shigella es la principal causa de disentería bacilar en todo el mundo. Se divide en cuatro especies, denominadas *S. flexneri*, *S. sonnei*, *S. dysenteriae* y *S. boydii*, que son distintas genómicamente y en su capacidad para causar enfermedad [54]. La salmonelosis y la shigelosis son las enfermedades más frecuentes de gastroenteritis aguda encontradas en seres humanos. El aumento en la reutilización de aguas residuales, especialmente en los países en desarrollo, ha hecho que los problemas relacionados con la calidad de las aguas residuales sean más importantes [55].

Posteriormente de las colonias aisladas, se seleccionó una colonia representativa de cada caja petri para ser inoculada nuevamente en 1 mL de caldo nutritivo, las muestras se incubaron a 37 °C por 24 h. Posteriormente a la incubación se depositaron 10 µL de cada muestra en 10 placas de "Nissui" numeradas, el objetivo de este análisis fue verificar por medio de coloración el tipo de bacterias presentes en la muestra de agua residual, en la Imagen 7 se muestran las interpretaciones de las coloraciones de acuerdo al instructivo de Compact Dry.

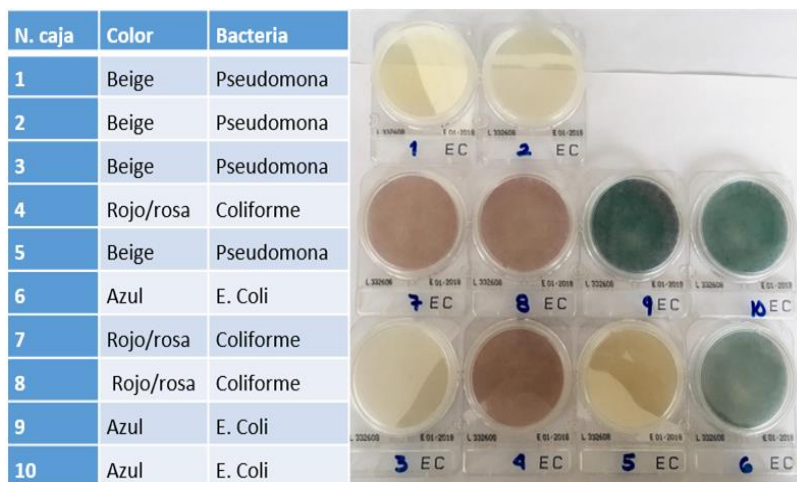


Imagen 7. Identificaciones obtenidas en Nissui EC Compac Dry de acuerdo con el tipo de bacteria sembrada Fuente: Solís, 2018.

Con el caldo nutritivo de las muestras tratadas y no tratadas ya cultivado se realizó un análisis de absorbancias, se colocaron 100 μ L de cada una las disoluciones en microplacas para medir las absorbancias. En la Tabla 7 se muestran los datos obtenidos de las absorbancias de efluente inicial, el agua tratada con *C. vulgaris* y el agua final con ambos tratamientos. Cada concentración se realizó por triplicado, por lo que los datos son el promedio de cada una de las diluciones, las absorbancias obtenidas son de las diluciones realizadas en donde la primera solución es la que presenta una mayor absorbancia, esto debido a que es la muestra con mayor concentración, en el caso de cada tratamiento se puede observar como las absorbancias van disminuyendo. En el caso del tratamiento con *C. vulgaris* hubo un evento interesante ya que posterior al tratamiento, se presentó una inhibición microbiana la cual se ve reflejada en la disminución de las absorbancias por lo que este evento fue un factor que contribuyó a la inactivación de microorganismos en el tratamiento fotoquímico.

Tabla 7. Absorbancias obtenidas en el efluente, con tratamiento con *C. vulgaris* y con tratamiento fotoquímico

Dilución	ERPT	Alga	Alga-Fotoquímico
10 ¹	0.993	0.53	0.043
10 ²	0.8145	0.181875	0.0553

10³	0.7715	0.138125	0.0357
10⁴	0.67275	0.10075	0.0292
10⁵	0.43875	0.1205	0.0199
10⁶	0.236125	0.121375	0.0148
10⁷	0.0515	0.078875	0.01489

A partir de los datos de la Tabla 7 se realizó un análisis estadístico de ANOVA para comparar los datos obtenidos de los diferentes tratamientos, al comparar el efluente residual contra el tratamiento con *C. vulgaris* se presentó una diferencia significativa con una $p= 0.01$, entre el efluente y el tratamiento *C. vulgaris* complementado con fotoquímica se presentó diferencia significativa aun mayor con una $p=0.001$ (Tabla 8) este comportamiento puede asociarse a la inactivación de bacterias posterior al tratamiento fotoquímico[56] con esto se puede argumentar que el tratamiento con *C. vulgaris* presenta efectividad, pero al complementarlo con fotodegradación hay mayor diferencia. La muestra inicial del efluente y el agua obtenida con los tratamientos son aguas con diferentes propiedades en cuanto a su carga microbiana, es necesario la aplicación del tratamiento fotoquímico para garantizar la inactivación de los microorganismos presentes y la degradación de compuestos orgánicos posterior a la biorremediación.

Tabla 8. Análisis estadístico comparativo de muestras.

Comparación de Tukey	Valor de P
Control vs Alga	$P>0.05$
Control vs Alga + Fotoquímica	$P>0.05$
ERPT vs alga	$P<0.01^{**}$
ERPT vs Alga+ Fotodegradación	$P<0.001^{***}$
Alga vs Alga + Fotodegradación	$p>0.05$

***Mayor nivel de significancia

9.4 Análisis microbiológico posterior a tratamiento fotoquímico

Se realizaron dos análisis microbiológicos, el primero se realizó a partir de los resultados obtenidos posterior al tratamiento con fotodegradación, para analizar si había alguna diferencia entre el orden de los tratamientos (fotodegradación y bioensayo), analizándose en diferente

orden el primero fue ERPT+ bioensayo con alga + tratamiento fotoquímico que aparece en la Imagen 8 y el segundo fue con la muestra del ERPT + tratamiento fotoquímico+ bioensayo alga que se muestra en la Imagen 9. Se observa que después de ser inoculadas con las muestras y permanecer 24 h a 37 °C las placas no presentaron formación de colonias microbianas, por lo que se argumenta que el orden del tratamiento no afecta los resultados microbiológicos. Está bien documentado que los microorganismos son inactivados por luz UV como resultado del daño fotoquímico a sus ácidos nucleicos. La radiación UV es absorbida por nucleótidos, los bloques de construcción del ADN y ARN celulares en una manera dependiente de la longitud de onda con picos de cerca de 200 y 260 nm [49], esta metodología también ha sido utilizada en la industria alimenticia y se ha demostrado que la luz UV es efectiva en la reducción de poblaciones microbianas de patógenos como *E. coli* O157: H7[57] este tipo de tecnología es aplicada por el daño a las membranas celulares, las enzimas o el ADN causando la muerte de microorganismos y siendo una alternativa de preservación y desinfección[47].

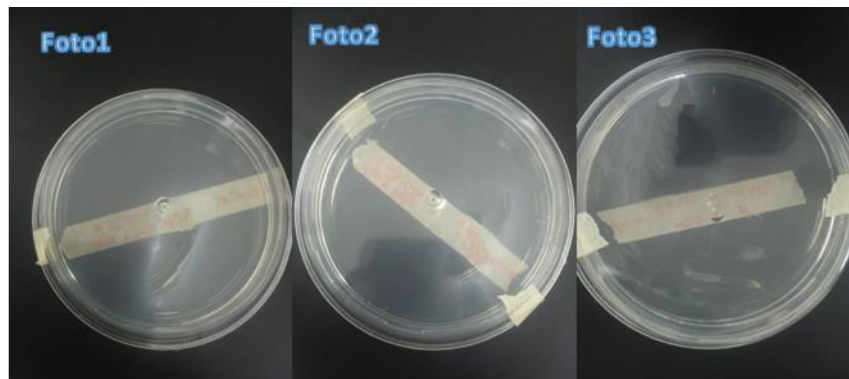


Imagen 8. Muestras microbiológicas de agua residual tratadas en orden Alga-Fotodegradación, Fuente: Solís, 2018

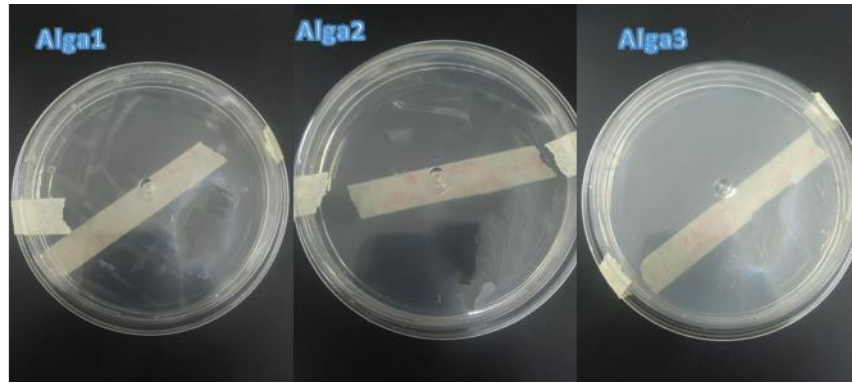


Imagen 9. Muestras microbiológicas de agua residual tratada en orden Fotodegradación-Alga, Fuente: Solís, 2018

Posteriormente se realizaron diluciones decimales con ambas muestras para comparar la formación de colonias microbianas antes y después del tratamiento. En la Imagen 10 se observa que las muestras no presentaron crecimiento colonial, se puede argumentar que el tratamiento fotoquímico resultó tener una alta eficiencia en la desinfección microbiológica del agua.

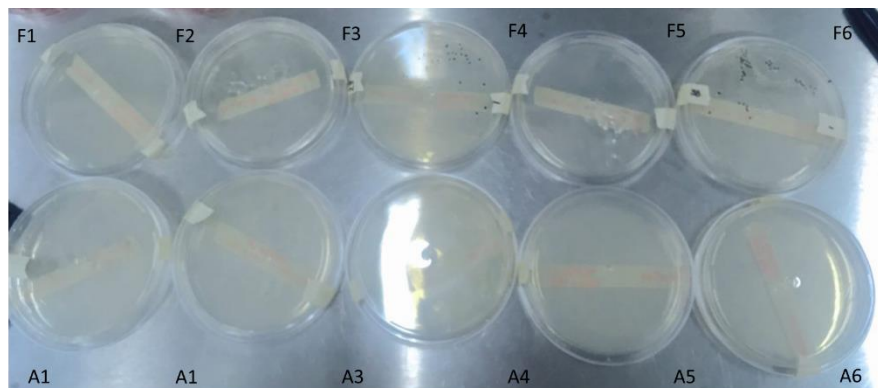


Imagen 10. Diluciones decimales en Agar Nutritivo de Alga+ fotodegradación y fotodegradación+ alga, Fuente: Solís, 2018

También se realizó el cultivo en Agar MacConkey, en la Imagen 11 se observa que estas muestras de igual manera no presentaron crecimiento microbiano complementando lo observado en el agar nutritivo.

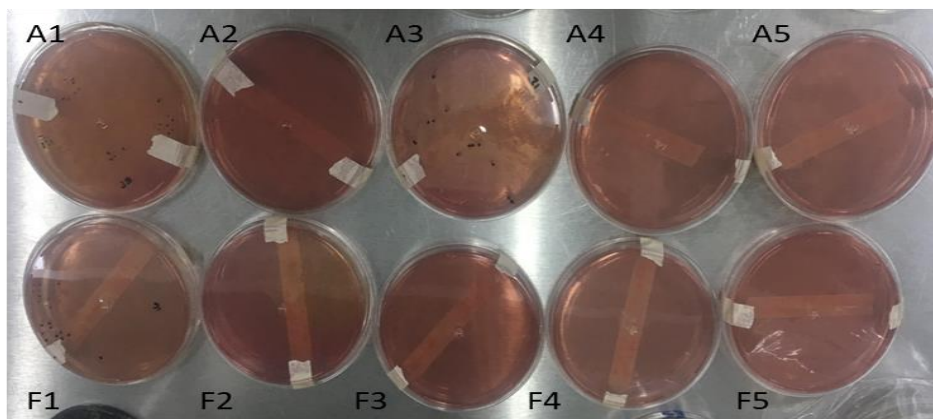


Imagen 11. A1 muestras alga + fotodegradación, F1 muestras fotodegradación + alga, Fuente: Solis, 2018.

9.5 Cromatografía de Gases

Se realizó la cromatografía de gases para identificar los compuestos orgánicos presentes en el agua en cada una de sus fases, iniciando con el ERPT que fue la fase inicial, seguida de la muestra de agua tratada con el alga *C. vulgaris*, para finalizar con el agua tratada con *C. vulgaris* acoplado a fotodegradación, los solventes que se utilizaron para la extracción fueron hexano para los compuestos apolares y cloroformo para los compuestos moderadamente polares. En las Tablas a 14 se muestran los compuestos que se detectaron en cada extracción, para la identificación de los compuestos orgánicos, se utilizó el porcentaje de similitud obtenida por la comparación de los espectros de masas con la base de datos y también se determinaron los espectros de masas para corroborar la identificación de los compuestos orgánicos, el área se utilizó para determinar el porcentaje detectado en el extracto con los solventes, así como la aparición de compuestos intermediarios y contaminantes persistentes.

En la Tablas 9 y 10 se muestran los principales compuestos detectados e identificados en la muestra de ERPT, la mayoría fueron, fungicidas, grasas y derivados del petróleo, y sobre todo fármacos. Un evento interesante fue la detección de tetracloroetileno que es una sustancia química de uso textil e industrial, es ampliamente utilizado como solventes en las industrias de procesamiento de metales, electrónica, impresión, papel y pintura [58]. Debido a su volatilidad, escapan fácilmente de las plantas de producción. Contaminan los cuerpos de agua y también se vuelven contaminantes dañinos del aire. En algunas circunstancias, las estructuras de sus moléculas pueden cambiarse a fosgeno, cloruro de dicloroacetilo y cloruro de formilo. Debido a

la posible carcinogenicidad, y su persistencia y bioacumulación en la biosfera, estos compuestos pueden poner en peligro la salud pública [59].

Tabla 9. Compuestos orgánicos detectados en el ERPT por CG-MS, extracción con cloroformo

Compuesto	Grupo funcional	Característica	Porcentaje detectado
Clorodifluoroacetamida	Amida	Utilizada como materia prima para la fabricación de medicamentos por su estructura cristalina[60]	9.03
Anfetamina	Amina	Es un agente adrenérgico sintético, potente estimulante del sistema nervioso central [61]	8.47
(Z)-9-octadecenoato de 2,3-dihidroxipropilo	Ácido carboxílico	Lípido polar que se hincha en agua para dar varias fases con distintas propiedades reológicas[62].	48.51
ftalato de dibutilo	Ester	se utiliza en la fabricación de plásticos flexibles que se encuentran en una variedad de productos de consumo[63].	6.83

Tabla 10. Compuestos orgánicos detectados en el ERPT por CG-MS, extracción con hexano

Compuesto	Grupo funcional	Característica	Porcentaje Detectado
Fluoxetina	Aromático fluorado	La fluoxetina es un antidepresivo de la clase Inhibidores Selectivos de la Recaptación de Serotonina[64].	5.88
1,3-dimetilbenceno	Hidrocarburo aromático	Se utiliza en la producción de ácido isoftálico, que se utiliza como monómero copolimerizante para alterar las propiedades del tereftalato de polietileno[65].	4.75
3-(dimetilaminometileno)-4-(1,2,4-triazol-3-il)-furazan,	Heterocíclico nitrogenado	No especificado	8.08
Ftalato de 2-pentilpropilo	Ester	compuesto de partida importante en numerosas síntesis orgánicas, sobre todo de colorantes del grupo trifenilmetilo[66]	4.54

Norefedrina	Aromático	La norefedrina es un simpaticomimético que actúa principalmente al causar la liberación de NOREPINEPHRINE[67]	3.51
Octadecenoato de 2,3-dihidroxi-propilo	Monoacilgliceroles	Lípido polar que se hincha en agua para dar varias fases con distintas propiedades reológicas[68].	9.22
1,2-benzisotiazol-3-amina	Aromático	Tiene un modo de acción microbicida y fungicida[69]	1.11
Tetracloroetileno	Organoclorado	Líquido incoloro, no inflamable, pesado y con un olor parecido al éter. Normalmente usado como disolvente en limpieza de textiles y metales[70]	69.86
elaidato de 2,3-dihidroxi-propilo	Ester	Intermedios en lípidos ya que posee un mesomorfismo que exhibe cuando se dispersa en el agua varias de estas mesofases confieren metaestables[68]	2.25

Posteriormente al tratamiento con *C. vulgaris* el agua tratada presentó la degradación de algunos compuestos orgánicos presentes en el ERPT, un ejemplo de esto fue el caso de la metoxiamfetamina que es un derivado de la anfetamina que estuvo presente en el agua inicial, las sustancias que continuaron presentes posterior al bioensayo fueron, ftalato de 2-pentilpropilo y el tetracloroetileno. Cabe mencionar que la cantidad de compuestos presentes disminuyó para las muestras extraídas con hexano y cloroformo, esto probablemente por la absorción de compuestos orgánicos por parte del alga *C. vulgaris* detectadas e identificadas en la biomasa del alga y a la oxigenación presente en el ensayo (Tabla 11 y 12).

Tabla 11. Compuestos orgánicos detectados en agua tratada con *C. vulgaris* por CG-MS, extracción con hexano

Compuesto	Grupo funcional	Característica	Porcentaje Detectado
3-metoxiamfetamina	Amina	Es una droga estimulante de la familia de la anfetamina[71]	4
2-aminononadecano	Amina	No especificado[72]	4.42
(E)-ácido 9-octadecenoico	Ácido carboxílico	ácido graso monoinsaturado de la serie omega 9 típico de los aceites vegetales[73]	9
(Z)-13-octadecenal,	Aldehído	Controla las poblaciones de plaga[74]	59.58

Tabla 12. Compuestos orgánicos detectados en agua tratada con *C. vulgaris* por CG-MS, extracción con cloroformo

Compuesto	Grupo funcional	Característica	Porcentaje Detectado
Catina	Amina	Es una droga de la clase de fenetilamina y anfetamina que actúa como un estimulante [75]	5.75
(E)-ácido 9-octadecenoico	Ácido carboxílico	ácido graso monoinsaturado de la serie omega 9 típico de los aceites vegetales[73]	12.35
(Z)-13-octadecenal,	Aldehído	Controla las poblaciones de plaga[74]	49.79
ftalato de 2-pentilpropilo	Ácido carboxílico	compuesto de partida importante en numerosas síntesis orgánicas, sobre todo de colorantes del grupo trifenilmetilo[66]	2.58
Tetracloroetileno	Organoclorado	Líquido incoloro, no inflamable, pesado y con un olor parecido al éter. Normalmente usado como disolvente en limpieza de textiles y metales[70]	1.84

En el agua tratada de con *C. vulgaris* complementado con fotodegradación (Tablas 13 y 14) se observó una disminución notable en la cantidad de compuestos presentes, esto debido a la degradación de los compuestos que ocurrió durante el proceso fotoquímico, cabe mencionar que esta última etapa se caracteriza por la degradación de alquenos clorados, fenoles, aromáticos, cetonas, alcoholes, alcanos de compuestos, la aparición de nuevos compuestos demuestra la acción de este proceso [76]. Debido a la persistencia del tetracloroetileno este es el único compuesto inicial que continúa apareciendo en la etapa final del tratamiento. También se observa

la aparición de nuevos compuestos diferentes a los encontrados en la etapa inicial, estos compuestos son denominados intermediarios [77].

Tabla 13. Compuestos orgánicos detectados en agua tratada con *C. vulgaris* complementado con fotodegradación por CG-MS, extracción con cloroformo

Compuesto	Grupo funcional	Característica	Porcentaje Detectado
Tetracloroetileno	Organoclorado	Líquido incoloro, no inflamable, pesado y con un olor parecido al éter. Normalmente usado como disolvente en limpieza de textiles y metales[70]	20.5
3-metil-1-[(1H)-1,2,4-triazol-1-il]butan-2-ona	Cetona	Síntesis química e industrial[78]	45.85

Tabla 14. Compuestos orgánicos detectados en agua tratada con *C. vulgaris* complementado con fotodegradación por CG-MS, extracción con hexano

Compuesto	Grupo funcional	Característica	Porcentaje Detectado
Tetracloroetileno	Organoclorado	Líquido incoloro, no inflamable, pesado y con un olor parecido al éter. Normalmente usado como disolvente en limpieza de textiles y metales[70]	49.9
dihidrazina carbónica	Ácido carboxílico	utilizado en la industria, en el tratamiento del agua como eliminador de oxígeno del agua de la caldera; en la industria textil, como agentes de reticulación[79]	1.84
1-octanamina	Amina	Utilizado para hacer otros productos químicos[80]	1.03
3-metilpenta-1,4-diene-3-ol	alcohol	No especificado	18.26

Tabla 15. Datos concentrados de los compuestos presentes en cada etapa del tratamiento, Rojo= Compuestos persistentes, Azul= Compuestos intermediarios de reacción.

Compuestos orgánicos detectados en el ERPT	Compuestos orgánicos detectados después de biorremediación	Compuestos orgánicos detectados después de biorremediación-- fotooxidación
Clorodifluoroacetamida	3-metoxiamfetamina	Tetracloroetileno
Anfetamina	2-aminononadecano	3-metil-1-[(1H)-1,2,4-triazol-1-il]butan-2-ona
(Z)-9-octadecenoato de 2,3-dihidroxiopropilo	(E)-ácido 9-octadecenoico	dihidrazina carbónica
ftalato de dibutilo	(Z)-13-octadecenal,	1-octanamina
Fluoxetina	Catina	3-metilpenta-1,4-dien-3-ol
1,3-dimetilbenceno	ftalato de 2-pentilpropilo	-
3-(dimetilaminometileno)mino)-4-(1,2,4-triazol-3-il)-furazan,	Tetracloroetileno	-
ftalato de 2-pentilpropilo	-	-
Norefedrina	-	-
Octadec-9-enoato de 2,3-dihidroxiopropilo	-	-
1,2-benzisotiazol-3-amina	-	-
Tetracloroetileno	-	-
elaidato de 2,3-dihidroxiopropilo	-	-

En la Tabla 15 en color rojo están los compuestos persistentes en ambos procesos aplicados, en color azul están los compuestos orgánicos intermediarios, se muestran los compuestos detectados en la muestra inicial y los detectados después de cada tratamiento, se observa que después de cada tratamiento se transformaron y disminuyeron en número, después de los 2 tratamientos persiste tetracloroetileno, una parte de este compuesto fue absorbido y detectado en la biomasa del alga, los demás compuestos son intermediarios de reacción, los cuales se transforman y para removerlos completamente se recomienda irradiar un mayor tiempo la muestra de agua.

De igual forma se realizó la cromatografía de gases a la biomasa producida por el alga, esta fue separada del agua mediante decantación y filtración, se secó en horno de convección a 70°C por 24h y posteriormente se pulverizó hasta obtener un polvo fino, en este caso por tratarse de un sólido, las extracciones con solvente se realizaron mediante el método de soxhlet en recirculación

continúa durante 8h, al finalizar el proceso se evaporó el exceso de solventes por medio de un rotavapor, el extracto concentrado se llevó a analizar en cromatografía de gases, en la Tabla 16 se encuentran los compuestos orgánicos extraídos de la biomasa utilizando etanol como solvente polar y hexano como solvente no polar, se observa que parte de los compuestos orgánicos presentes son absorbidos por el alga, principalmente el tetracloroetileno, que es un compuesto persistente aún después de haber aplicado la fotooxidación, un hallazgo interesante, fue el encontrar algunos compuestos presentes en el agua que fueron absorbidos por el alga, este fue el caso del tetracloroetileno y del ftalato, por lo que el alga *C. vulgaris* no solo remueve fósforo, nitrógeno y metales pesados, sino que también absorbe algunos compuestos orgánicos como aparece en las Tablas 16 y 17.

Tabla 16. Compuestos orgánicos extraídos con etanol en un equipo Soxhlet de la biomasa.

Compuesto	Grupo del compuesto	Características	Porcentaje Detectado
Glicerina	Alcohol	Se encuentra en cosméticos, medicina, plásticos, industria, alimentos, etc.[81]	55.44
Hexanal	aldehído	Líquido incoloro de olor penetrante y fuerte, utilizado en la producción de saborizantes [82].	2.15
1-Naftilmetil amina	amina	Utilizada en la síntesis de compuestos[83]	1.89
Fitol	alcohol	Fitol es un alcohol diterpénico acíclico que puede usarse como precursor para la fabricación de formas sintéticas de vitamina E y vitamina K1, es un componente de la clorofila [84]	38.39

Tabla 17. Compuestos orgánicos extraídos con hexano en un equipo Soxhlet de la biomasa

Compuesto	Grupo del compuesto	Características	Porcentaje Detectado
1-metilciclopentanol	alcohol	Se utiliza para la producción de productos químicos y farmacéuticos de fragancias [85]	0.64

Tetracloroetileno	organoclorado	Líquido incoloro, no inflamable, pesado y con un olor parecido al éter. Normalmente usado como disolvente en limpieza de textiles y metales[59]	0.43
Oxalato de hexil ciclohexílico	Ester	Compuesto oxidativo [86]	2.83
Propanoato de 2-metil-, 2-etil-3-hidroxihexílico	Ester	consideran volátiles clave y compuestos de gran sabor o sabor active, como componente artificial [87].	1.44
Ftalato de isobutil, undecilo	Ester	Algunos ftalatos son sustancias químicas que alteran el sistema endocrino, lo que puede afectar el funcionamiento de los ecosistemas y la salud pública [66].	1.12
Hexadecanamida	Amina	La amida palmítica es una amida de ácido graso primaria procedente del ácido palmítico. Las amidas de ácidos grasos primarios (R-CO-NH ₂) son una clase de compuestos que se han aislado y caracterizado recientemente solo a partir de fuentes biológicas [82].	1.70
9,12,15-octadecatrienato de etilo	Ester	El linolenato de etilo se puede usar como molécula de referencia en sistemas desarrollados para medir ésteres de ácidos grasos derivados de tejidos, membranas y lípidos, especialmente asociados con el abuso del alcohol [88].	3.22
Oleamida	Amida	Derivada del ácido oleico ácido graso. Es un sólido ceroso incoloro, se forma de manera natural [89].	8.00
(Z)-13-Octadecenal	Cetona	Controla las poblaciones de plaga[74]	41.98
Ftalato de 2-etilhexil	monoéster de ácido dicarboxílico	El monoéster (MEHP), metabolito principal del diéster (DEHP) se encuentran ampliamente distribuidos en los alimentos y el medio ambiente debido a su uso como plastificantes en productos de consumo, materiales de envasado de alimentos y dispositivos biomédicos [90]	0.38

9.6 Toxicidad

9.6.1 *Daphnia magna*

Antes de realizar el ensayo de toxicidad aguda se realizó el ensayo exploratorio para poder observar el comportamiento de la *Daphnia* en el ERPT en comparación con un control, este ensayo también se realiza para poder saber cuáles son las concentraciones adecuadas que se deben utilizar para calcular la dosis letal media. Para realizar el ensayo exploratorio, se realizaron tres soluciones al 100, 75, y 50% del ERPT y del agua tratada con alga-fotodegradación junto con un control de agua destilada, se colocaron dos neonatos pequeños en cada una de las diluciones durante 48 horas en las condiciones mencionadas, como se muestra en la Imagen 12. Transcurridas las primeras 12 h se observó que los dos individuos se encontraban vivos y con alta movilidad, a las 24 los resultados fueron similares, todos los individuos presentaban sobrevivencia y movilidad, por lo cual el ensayo continuó 24 h más. Posterior a las 48 h los resultados se mantuvieron constantes, por lo que se finalizó el ensayo concluyendo que el efluente residual no presentaba una toxicidad peligrosa, y debido a la alta sobrevivencia de los individuos no fue posible determinar una dosis letal media, de acuerdo a la NOM-074-ECOL-1994 [91] por las características de sobrevivencia de *Daphnia magna*, esta agua se podría catalogar como “Inocua”.

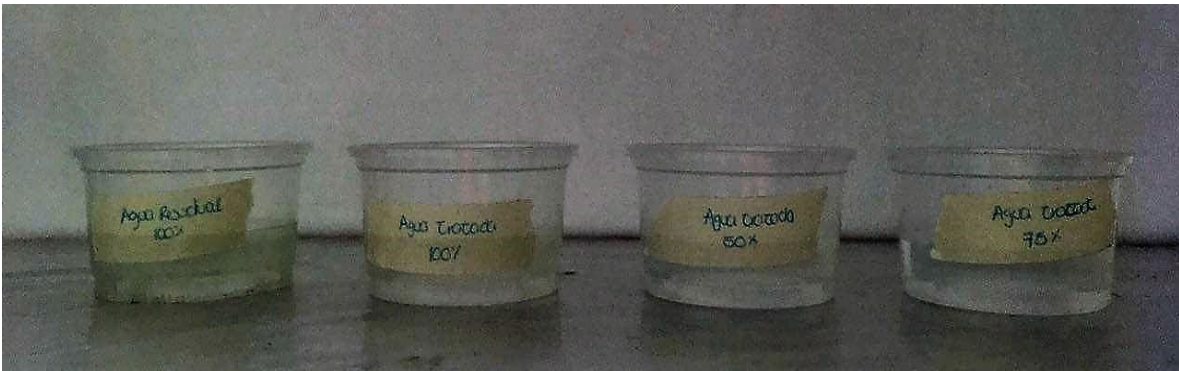


Imagen 12. Crecimiento de *Daphnia magna* en soluciones al 50% y 100% de agua residual y agua tratada con *C. vulgaris* y fotodegradación.

9.6.2 *Allium sativum*

Debido a que los resultados obtenidos con *Daphnia magna*, no mostraron indicios de toxicidad, se decidió profundizar a nivel celular realizando el ensayo de Genotoxicidad con *Allium sativum*, para esto se colocaron 60 ajos en concentraciones de 3.6, 6.12, 12.5, 25, 50, 100 % del efluente

residual y del tratamiento alga complementado a fotodegradación con 5 réplicas cada uno (Imagen 13), se irrigaron los ajos con la concentración de agua correspondiente por 5 días hasta generar el crecimiento de la raíz, posteriormente se midieron las raíces (Imagen 14 y 15) y fueron cortadas y fijadas con una solución 1:3 de ácido acético-etanol. Las células producidas en la zona meristemática presentan un tamaño pequeño y son muy parecidas unas a otras. La región de crecimiento corresponde a la zona en la que dichas células se elongan verticalmente mediante la absorción de agua hacia la vacuola. Este es el mecanismo principal mediante el cual la raíz crece longitudinalmente. Dicho estiramiento requiere, sin embargo, un aumento en la cantidad de citoplasma celular. En la región de elongación también se inicia el proceso de diferenciación y especialización celular [77].



Imagen 13. Montaje del ensayo con Allium sativum.

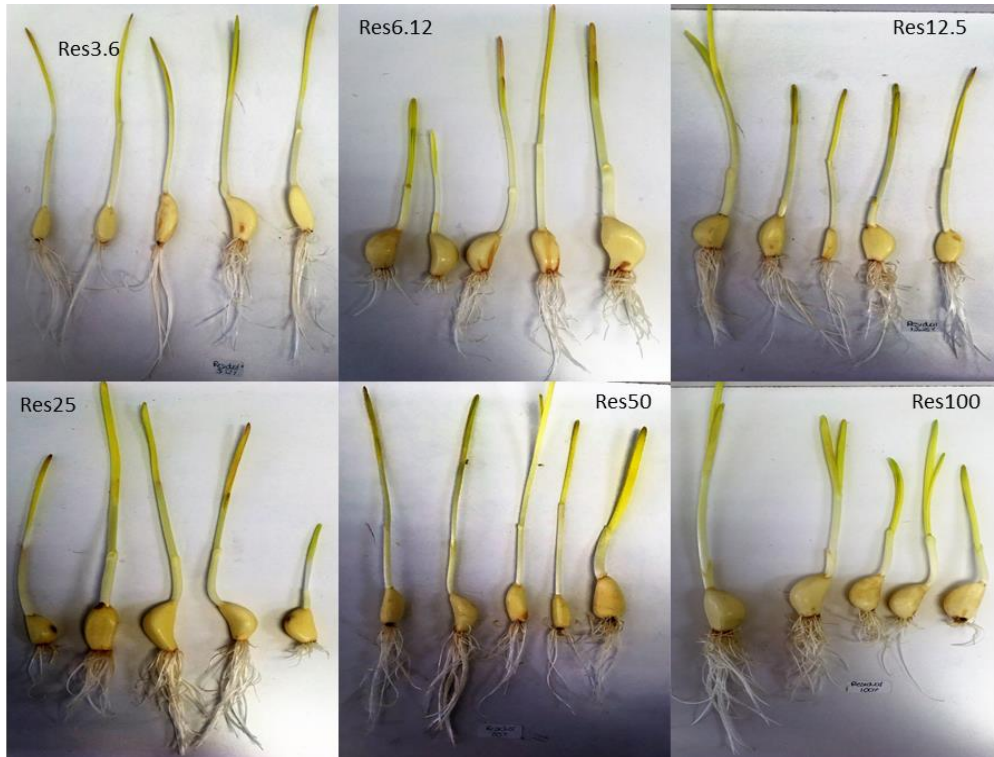


Imagen 14. Crecimiento de raíces en ajos irrigados en concentraciones del ERP 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, Fuente: Solís, 2018



Imagen 15. Crecimiento de raíces en ajos irrigados con concentraciones de agua tratada con alga- fotodegradación al 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, Fuente: Solís, 2018

La fijación se realizó para evitar la autólisis, proteger la pieza del ataque bacteriano e insolubilizar los componentes celulares que se desean estudiar, posteriormente a la fijación se tomó una raíz significativa de las muestras para ser hidrolizada en la solución de ácido clorhídrico, se tiñe con azul de metileno y se observó en el microscopio.

Se tomaron 7 raíces representativas de cada concentración, cada raíz se observó en el microscopio y se tomaron 3 micrografías donde se observarían entre 100 y 150 células, posteriormente cada micrografía fue analizada para contabilizar y clasificar el número de células anómalas, las fases anómalas y el número de células en mitosis para calcular el índice mitótico, en la Imagen 16 se muestran la micrografía de las células presentes en los ajos regados con el efluente residual y así como la micrografía de las células presentes en los ajos regados con el agua obtenida del sistema acoplado propuesto, existe una notable diferencia entre las células, esto se puede observar comparando el tamaño, forma y sobre todo las fases celulares presentes.

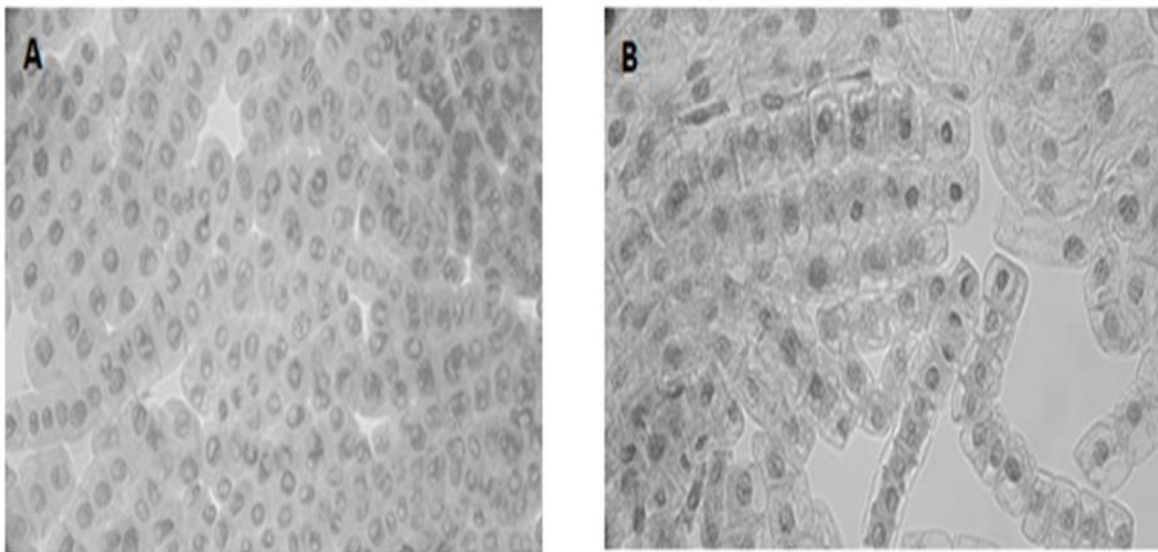


Imagen 16. A) Micrografía células del ensayo de agua residual al 100%, B) Micrografía células del ensayo agua tratada 100%

Posteriormente al análisis microscópico de cada una de las raíces de las diferentes concentraciones, se realizó una tabla donde se concentraron los datos obtenidos para cada muestra. Los resultados reflejan la actividad celular en punta de raíz *Allium sativum*, mostrando

que los ajos tratados con el agua obtenida del tratamiento con *C. vulgaris* acoplado al tratamiento fotoquímico presentaron un menor número de células en mitosis, mientras que las muestras regadas con las concentraciones del efluente residual presentaron un aumento en el índice mitótico y en las anomalías celulares. En las Tablas 18 y 19 se muestran los datos obtenidos en el análisis celular, anotando el número de células alargadas, fases anómalas, polinúcleos, el número de células en mitosis y el total de células contadas.

Tabla 18. Datos concentrados de disoluciones de muestras de efluente residual Abreviaturas: **TE**=Tratamiento, **No.**=Número de muestra, **AC**= Número de células con alargamiento celular, **PN** = Número de células con Polinúcleos, **PA**= Número de células en Profase anómala, **MF**= Número de células en Metafase anómala, **AA**= Número de células en Anafase anómala, **TF**= Número de células en Telofase anómala, **IPF**= Número de células con Incremento en profase, **N.CA**= Número de células anómalas, **TCC**=Total de células contadas, **%**=Porcentaje de células anómalas por imagen, **N.CM**= Número de células en mitosis, **IM**= índice mitótico, **InM**=inhibición mitótica

TE	No.	AC	PN	PA	MF	AA	TF	IPF	N.CA	TCC	%	N. CM	IM	InM
3.12%	1	2	4	1	0	0	0	0	7	132	2.214	20		
	2	0	0	1	0	0	0	0	1	105		19		
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	108		20		
	4	0	2	0	0	0	0	0	2	107		32		
	5	0	2	0	0	0	0	0	2	100		17		
	6	0	1	0	1	0	0	0	2	115		20		
	7	2	0	0	0	0	0	1	3	101		30		
Prom.									2.43	110	2.214	22.57	20.57	21.84
6.25%	1	1	4	1	0	0	0	0	6	130	6.133	30		
	2	2	3	0	0	0	0	0	5	92		12		
	3	6	5	0	1	0	0	0	12	100		20		
	4	0	4	0	0	0	0	0	4	100		30		
	5	2	4	0	0	0	0	0	6	102		0		
	6	2	0	0	0	0	0	2	4	125		34		
	7	4	5	0	0	0	0	0	9	101		50		
Prom.									6.57	107	6.133	25.14	23.47	10.84
12.50%	1	5	0	0	0	0	0	3	8	90	6.133	30		
	2	0	0	2	4	0	2	0	8	127		33		
	3	0	2	0	0	0	1	0	3	84		29		
	4	0	2	0	1	1	3	0	7	102		28		
	5	0	5	0	1	0	2	0	8	130		38		
	6	2	9	0	1	1	1	0	14	125		22		
	7	0	9	0	0	0	0	0	9	120		26		

Prom.									8.14	111	7.326	29.43	26.48	-0.60
25.00%	1	2	0	0	0	0	0	0	2	116	2.872	30		
	2	0	1	0	1	0	0	0	2	104		33		
	3	2	1	1	0	0	0	0	4	103		29		
	4	0	1	0	0	0	2	0	3	124		28		
	5	0	3	0	0	0	0	0	3	108		38		
	6	0	3	0	0	0	0	0	3	110		22		
	7	0	4	0	0	0	0	1	5	101		18		
Prom.									3.14	109	2.872	28.29	25.85	1.79
50.00%	1	2	4	0	0	0	0	0	6	132	5.793	20		
	2	2	2	2	0	0	2	0	8	77		27		
	3	4	0	0	1	0	1	0	6	120		32		
	4	0	0	1	0	0	1	0	2	127		32		
	5	2	1	4	0	0	0	2	9	107		17		
	6	2	4	0	1	0	2	0	9	111		28		
	7	5	0	0	1	0	0	0	6	120		20		
Prom.									6.57	113	5.793	25.14	22.17	15.78
100.00%	1	0	0	0	0	0	0	0	0	101	4.304	55		
	2	3	0	0	0	0	0	0	3	90		27		
	3	2	0	2	0	0	0	0	4	109		22		
	4	3	6	0	0	0	0	0	9	118		14		
	5	0	3	1	2	0	0	0	6	107		22		
	6	0	0		0	0	0	0	0	72		23		
	7	2	3	1	0	2	0	0	8	100		30		
Prom.									4.29	100	4.304	27.57	27.69	-5.21

Tabla 19. Datos concentrados de disoluciones de agua tratada con *C. vulgaris* y fotodegradación

TE	No.	AC	PN	PA	MF	AA	TF	IPF	N.CA	TCC	%	N.CM	IM	InM
3.12%	1	3	2	0	1	0	0	0	6	117		18	24.3	7.7
	2	2	1	0	1	4	0	0	8	92		92		
	3	0	15	0	1	0	0	0	16	84		17		
	4	0	12	0	0	0	0	0	12	110		20		
	5	0	3	1	2	0	0	0	6	132		12		
	6	6	6		0	0	0	0	12	112		14		
	7	5	3	0	0	1	0	0	9	106		10		
		16							9.86	108	9.16	26.1		
6.25%	1	2	0	0	1	0	3	0	6	112		12	27.69	-5.21
	2	5	5	0	0	0	3	0	13	90		35		
	3	6	0	0	0	0	0	0	6	101		45		
	4	2	2	0	0	0	0	0	4	75		20		

	5	6	7	0	3	0	4	3	23	100		19		
	6	7	10	2	0	0	0	0	19	105		15		
	7	8	9	0	1	1	0	0	19	112		13		
									12.9	99.3	12.9	22.7	22.9	13.1
12.50%	1	3	3	0	1	4	0	0	11	100		13		
	2	6	6	0	0	0	0	0	12	126		34		
	3	9	2	2	0	0	0	0	13	130		21		
	4	6	3	0	1	0	0	0	10	131		130		
	5	0	14	0	0	0	2	0	16	113		10		
	6	2	9	0	1	0	0	0	12	130		30		
	7	11	0	0	0	2	0	0	13	100		15		
									12.4	119	10.5	36.1	30.5	-15.8
25.00%	1	2	31	0	0	0	2	0	35	130		54		
	2	0	8	0	0	0	0	0	8	140		34		
	3	0	2	0	2	8	3	0	15	120		21		
	4	10	4	0	0	0	1	0	15	134		125		
	5	8	7	0	3	0	0	0	18	120		10		
	6	15	1	0	1	0	0	0	17	106		30		
	7	13	4	0	0	0	0	0	17	112		17		
									17.9	123	14.5	41.6	33.8	-28.3
50.00%	1	2	6	0	0	0	0	0	8	100		95		
	2	10	10	0	2	0	0	0	22	100		90		
	3	2	12	0	0	0	0	0	14	100		80		
	4	26	26	1	0	0	0	0	53	110		96		
	5	12	11		0	0	0	0	23	113		75		
	6	3	3	0	0	0	0	0	6	132		88		
	7	5	9	0	1	0	0	5	20	110		70		
									20.9	109	19.1	84.9	77.6	-195.0
100.00%	1	8	24	4	2	4	0	0	42	100		87		
	2	10	34	2	0	0	0	0	46	112		100		
	3	2	11	0	2	0	0	0	15	107		95		
	4	50	0	0	8	8	0	0	66	134		25		
	5	0	25	3	2	7	0	0	37	113		8		
	6	10	26	0	0	0	0	4	40	132		5		
	7	12	18	0	2	0	0	1	33	131		20		
									39.9	118	33.7	48.6	41.0	-55.8
Control	1	2	3	1	0	0	0	0	5	132		20		
	2	0	0	1	0	0	0	0	1	105		19		
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	108		20		
	4	0	2	0	0	0	0	0	2	107		32		
	5	0	2	0	0	0	0	0	2	100		20		

	6	0	1	0	1	0	0	0	2	115		20		
	7	2	0	0	0	0	0	1	3	101		30		
Prom.									2.3	110	2.5	25.03	25	20.4

En la Tabla 20 se muestra resumidamente los datos más relevantes obtenidos del análisis celular. El mayor índice mitótico de las concentraciones analizadas fue para los ensayos 50% y 100% de la muestra de ERPT en comparación con el control. La reducción extrema del índice mitótico se observó principalmente en las concentraciones de (3.12, 6.25, 50%) en comparación con control. En términos generales, valores del índice mitótico inferiores al valor del control negativo (agua) indican alteraciones inhibitorias, derivadas de las sustancias químicas utilizadas en el ensayo. Los valores del índice mitótico superiores al control negativo indican un incremento en la división celular, mostrando un desorden en la proliferación celular evidenciando una sustancia química con potencial para formación de tejido tumoral [92].

Tabla 20. Porcentaje de aberraciones, número de células en mitosis y porcentaje de índice mitótico.

Concentraciones	% de células aberrantes		Número de células en mitosis		IM (%)	
	ERPT	Alga-Foto	ERPT	Alga-Foto	ERPT	Alga-Foto
3.12	9.16	2.21	26.14	22.57	24.30	20.57
6.25	12.95	6.13	22.71	25.14	22.88	23.47
12.5	10.5	7.33	36.14	29.43	30.48	26.48
25	14.50	2.87	41.57	28.29	33.76	25.85
50	19.1	5.79	84.86	25.14	77.65	22.17
100	33.7	4.30	48.57	27.57	41.01	27.69
Control	2.5		25		25.03	

Se realizó en análisis estadístico de ANOVA a partir de los datos obtenidos de los porcentajes de las células aberrantes del ERPT y el agua tratada con *C. vulgaris* y fotoquímica, se realizó la comparación estadística mostrando que, entre el efluente residual y el agua tratada, se observó diferencia significativa $p=0.0001$; por lo que no hubo diferencias entre el agua control (agua purificada) y el agua tratada. Se presenta un comportamiento diferente entre las aberraciones presentes en el efluente y en el agua ya tratada, aunado a una disminución en el número de

aberraciones, lo cual para esta experimentación es deseable, se observó que tanto el agua tratada y el agua control presentaron un comportamiento similar. Cabe mencionar que esto no significa que el agua tratada cumpla con los estándares de un agua potable, ya que a pesar de que se disminuyó tanto el número de aberraciones, el índice mitótico y la carga microbiana, esta agua aún cuenta con contaminantes persistentes como se detectó en CG-MS.

9.7 Aberraciones presentes

Las aberraciones cromosómicas se caracterizan por cambios en la estructura cromosómica o en el número total de cromosomas; esto puede ocurrir espontáneamente o como resultado de la exposición a agentes físicos o químicos. De las micrografías analizadas se observó la presencia de anomalías en el ciclo celular producido por la toxicidad de los compuestos presentes en las muestras analizadas, observándose distintos tipos de aberraciones o anomalías cromosómicas dentro de las distintas etapas del ciclo celular. En la Imagen 17 se muestran algunas de las aberraciones encontradas en las muestras de agua. Las aberraciones son consecuencia de una segregación anormal de los cromosomas, generado por la acción de agentes aneugénicos. Las anomalías como puentes y rompimientos indican acciones clastogénicas, mientras que los cromosomas errantes o perdidos, mutilaciones, cromosomas pegajosos, multipolaridad y C-metafase, resultan de efectos aneugénicos. Cuando las alteraciones morfológicas causadas por la acción de los agentes químicos ocurren en la interfase nuclear se llaman aberraciones nucleares. Generalmente, estas alteraciones se manifiestan principalmente como núcleos lobulados, núcleos desplazados, polinúcleos y micronúcleos [92]. Existen estudios que incluyen la comparación de la genotoxicidad del suelo obtenido de dos sitios agrícolas diferentes, suelo tratado con plaguicidas con *Allium cepa* como indicador [93] otras investigaciones han demostrado que el herbicida imidazolinona causa disminución en el IM debido a su actividad citotóxica, causando daños en el ADN de *A. cepa* [94] Los ensayos realizados con *A. cepa* han mostrado que este organismo de prueba es eficiente y confiable para evaluar la calidad del agua de los ríos y, por lo tanto, debe incluirse en los ensayos de rutina llevados a cabo en los estudios de biomonitorio. Algunos resultados de efluentes refinería, pueden tener en su composición sustancias o compuestos químicos que podrían actuar en los microtúbulos, huso mitótico, matriz proteica celular, material genético, membrana citoplasmática y en el citoesqueleto, lo que sugiere

que estos los efluentes presentan actividades citotóxicas, aneugénicas y clastogénicas, comprometiendo, en esta colección, la calidad de las aguas donde se descargan [95].

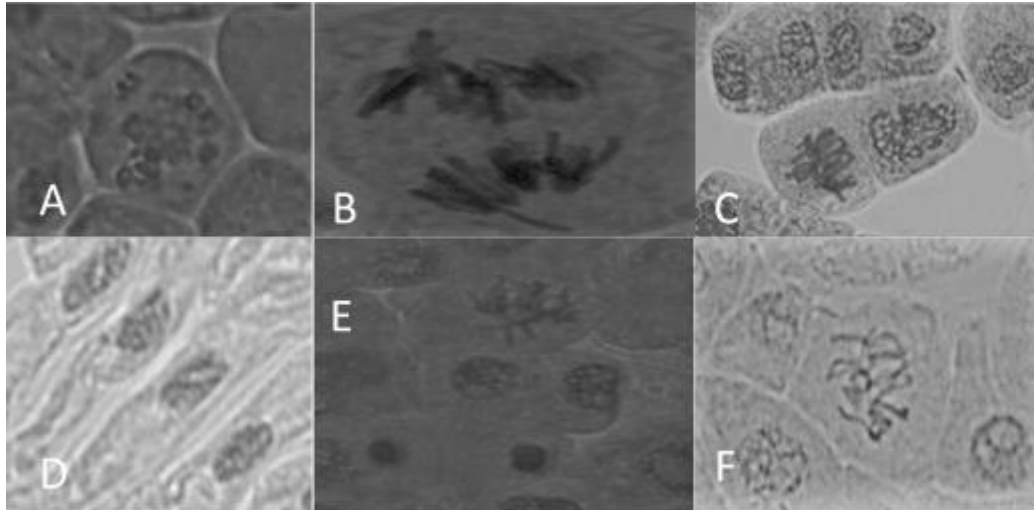


Imagen 17. Polinúcleos, B puente anafásico, C profase anómala D alargamiento celular, E, F, Metafase con cromosomas rotos, Fuente: Solís, 2018.

La prueba con *Allium sativum* mostró resultados positivos para productos químicos que se puede encontrar en efluentes industriales mutagénicos y cancerígenos y esto se ve reflejado en el porcentaje de aberraciones en anafase y telofase[96]. La aparición de micro núcleos, según varios autores se interpretó como un indicador de clastogénico y efectos aneugénicos [97].

X Conclusiones

Se demostró que el crecimiento celular relativo en los cultivos de *Chlorella vulgaris* con agua residual, indica que estos medios contienen alta disponibilidad de nutrientes, y por lo tanto constituyen sustratos alternativos para su desarrollo y utilización como biorremediador, *C. vulgaris* presentó una eficiencia de en la metabolización de nitrógeno, fósforo y así como la absorción de metales pesados. Se redujo N en un 95%, P en un 75% y hubo una absorción de metales comparada con la muestra inicial, presentó una absorción de plomo de un 11%, cadmio de 11% y níquel de 93%. El tratamiento fotoquímico acoplado mejoró la calidad de agua tratada previamente con el alga. Se observó que el alga *C. vulgaris*, presentó una actividad antimicrobiana que, combinada con el tratamiento fotoquímico, inhibió totalmente la carga bacteriana en el agua. El índice mitótico y el número de aberraciones del agua inicial fue de 41% y 33% respectivamente disminuyendo en el agua tratada hasta 27% y 4% tomando como referencia los datos obtenidos en el control de agua purificada donde el índice mitótico fue de 25% y el porcentaje de células aberrantes fue de 2.5%, estos datos van directamente relacionados con el grado de toxicidad como un parámetro de calidad en las muestras. De 13 compuestos orgánicos presentes en el ERPT, se removieron 11 compuestos con el alga y se detectaron 5 compuestos en transformación. Después de aplicar ambos tratamientos, se detectó sólo un compuesto persistente (tetracloroetileno) y 3 productos intermediarios de la reacción. La biomasa de *C. vulgaris* absorbió los metales pesados presentes en ERPT y algunos compuestos orgánicos persistentes. Se observó que *Chlorella vulgaris* absorbe parte de tetracloroetileno, un compuesto persistente. En base a la información recabada en el trabajo de tesis, se concluye con que en el Estado de Puebla las plantas de tratamiento no operan de manera adecuada por lo que el agua obtenida posterior al tratamiento es un agua de baja calidad que aun contiene contaminantes y patógenos causantes de daños a salud, existe un nulo conocimiento sobre el impacto de los efluentes residuales tanto en los seres humanos como en los ecosistemas. Como una problemática grave y difícil de erradicar esta la falta de interés por parte de las autoridades para invertir en plantas de tratamiento completas y programas de capacitación. Este trabajo se centró en la resolución de un problema que es parte de una red de interacciones complejas.

XI Bibliografía

- (1) Smith, V. H.; Schindler, D. W.;(2009) Eutrophication Science: Where Do We Go from Here? *Trends Ecol. Evol.* **24** [4], 201–207.
- (2) Kesaano, M.; Sims, R. C.;(2014) Algal Bio Film Based Technology for Wastewater Treatment. *ALGAL*.
- (3) Nature, T. H.; Iii, W. C.; Petrology, W. F.; Creation, S. M.; Nature, D. M.; Delamination, S. M.;(2004) The Impact of Surface-Adsorbed Phosphorus on Phytoplankton Redfield Stoichiometry. **432** [December], 897–901.
- (4) de-Bashan, L. E.; Bashan, Y.;(2010) Immobilized Microalgae for Removing Pollutants: Review of Practical Aspects. *Bioresour. Technol.* **101** [6], 1611–1627.
- (5) Gonçalves, A. L.; Pires, J. C. M.; Simões, M.;(2017) A Review on the Use of Microalgal Consortia for Wastewater Treatment. *Algal Res.* **24**, 403–415.
- (6) Malik, N.;(2002) Biotechnological Potential of Immobilised Algae for Wastewater N, P and Metal Removal: A Review. *BioMetals* **15**, 377–390.
- (7) Benemann, J. R.;(2009) Microalgal Biofuels: A Brief Introduction. *Microalgae Biofuels A Br. Introd.* 1–13.
- (8) Mata, T. M.; Martins, A. A.; Caetano, N. S.;(2010) Microalgae for Biodiesel Production and Other Applications: A Review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **14** [1], 217–232.
- (9) Maguire-Boyle, S. J.; Barron, A. R.;(2014) Organic Compounds in Produced Waters from Shale Gas Wells. *Environ. Sci. Process. Impacts* **16** [10], 2237–2248.
- (10) Elliott, E. G.; Ettinger, A. S.; Leaderer, B. P.; Bracken, M. B.; Deziel, N. C.;(2017) A Systematic Evaluation of Chemicals in Hydraulic-Fracturing Fluids and Wastewater for Reproductive and Developmental Toxicity. *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* **27** [1], 90–99.
- (11) Ferrer, I.; Thurman, E. M.;(2015) Chemical Constituents and Analytical Approaches for Hydraulic Fracturing Waters. *Trends Environ. Anal. Chem.* **5**, 18–25.
- (12) Handy, R. D.;(2008) Systems Toxicology: Using the Systems Biology Approach to Assess Chemical Pollutants in the Environment. *Adv. Exp. Biol.* **2** [0], 249–281.
- (13) Sharma, C. B. S. R.; Panneerselvan, N.;(1990) *Genetic Toxicology of Pesticides in Higher Plant Systems*; Vol. 9.
- (14) Zhang, Z.; Wang, X.; Li, J.; Liu, C.; Zhang, Q.;(2016) Inhibitory Effects of Enteromorpha Linza Polysaccharide on Micronucleus of Allium Sativum Root Cells. *Int. J. Biol. Macromol.* **87**, 252–255.
- (15) Abid-Essefi, S.; Zaied, C.; Bouaziz, C.; Salem, I. Ben; Kaderi, R.; Bacha, H.;(2012) Protective

Effect of Aqueous Extract of *Allium Sativum* against Zearalenone Toxicity Mediated by Oxidative Stress. *Exp. Toxicol. Pathol.* **64** [7–8], 689–695.

- (16) Mohammed, K. P.; Aarey, A.; Tamkeen, S.; Jahan, P.;(2015) Forskolin: Genotoxicity Assessment in *Allium Cepa*. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **777** [1], 29–32.
- (17) Monteiro, C. M.; Castro, P. M. L.; Malcata, F. X.;(2012) Metal Uptake by Microalgae: Underlying Mechanisms and Practical Applications. *Biotechnol. Prog.* **28** [2], 299–311.
- (18) Farooq, U.; Kozinski, J. A.; Khan, M. A.; Athar, M.;(2010) Biosorption of Heavy Metal Ions Using Wheat Based Biosorbents - A Review of the Recent Literature. *Bioresour. Technol.* **101** [14], 5043–5053.
- (19) Safi, C.; Zebib, B.; Merah, O.; Pontalier, P.-Y.; Vaca-Garcia, C.;(2014) Morphology, Composition, Production, Processing and Applications of *Chlorella Vulgaris*: A Review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **35**, 265–278.
- (20) Miao, M. sheng; Yao, X. dong; Shu, L.; Yan, Y. jie; Wang, Z.; Li, N.; Cui, X. tong; Lin, Y. min; Kong, Q.;(2015) Mixotrophic Growth and Biochemical Analysis of *Chlorella Vulgaris* Cultivated with Synthetic Domestic Wastewater. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **113**, 120–125.
- (21) Rodrigues, M. S.; Ferreira, L. S.; Carvalho, J. C. M. de; Lodi, A.; Finocchio, E.; Converti, A.;(2012) Metal Biosorption onto Dry Biomass of *Arthrospira (Spirulina) Platensis* and *Chlorella Vulgaris*: Multi-Metal Systems. *J. Hazard. Mater.* **217–218**, 246–255.
- (22) Khoo, C. G.; Woo, M. H.; Yury, N.; Lam, M. K.; Lee, K. T.;(2017) Dual Role of *Chlorella Vulgaris* in Wastewater Treatment for Biodiesel Production: Growth Optimization and Nutrients Removal Study. *Nihon Enerugi Gakkaishi/Journal Japan Inst. Energy* **96** [8], 290–299.
- (23) Agua en el planeta – Agua.org.mx <https://agua.org.mx/en-el-planeta/> (accessed Apr 30, 2018).
- (24) AGUAS RESIDUALES EL RECURSO DESAPROVECHADO;(2017) *Aguas Residuales*.
- (25) UNESCO;(2017) *Aguas Residuales*.
- (26) De La Peña, M. E.; Ducci, J.; Zamora, V.;(2013) Tratamiento de Aguas Residuales En México. *Banco Intern. Desarro.* **42**.
- (27) Conagua;(2011) Estadísticas Del Agua En México. *Semarnat/Conagua* 182.
- (28) Aguas residuales y contaminación en México – Agua.org.mx <https://agua.org.mx/actualidad/aguas-residuales-contaminacion-en-mexico/> (accessed Apr 9, 2018).
- (29) Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) <http://www.inegi.org.mx/inegi/default.aspx?s=inegi&c=532&pred=1> (accessed Apr 9, 2018).

- (30) García-Nieto, E.; Carrizales-Yañez, L.; Juárez-Santacruz, L.; García- Gallegos, E.; Hernández-Acosta, E.; Briones-Corona, E.; Vázquez-Cuecuecha, O. G.;(2011) Plomo Y Arsénico En La Subcuenca Del Alto Atoyac En Tlaxcala, México. *Rev. Chapingo Ser. Ciencias For. y del Ambient.* **XVII** [1], 7–17.
- (31) Asociación Interciencia., A.; Roubicek, D.; Sán-chez, P.; Sato, M.; Villarreal, E. C. V.;(2001) Interciencia. *Mut. Res* **49** [12], 119 citation_lastpage=126.
- (32) (2011) *Inventario Nacional de Plantas Municipales de Potabilización y de Tratamiento de Aguas Residuales En Operación Diciembre de 2011*; MEXICO.
- (33) Espigares García, M.; Pérez López, J. a.;(1985) Aguas Residuales: Composicion. *Aguas Residuales. Compos.* 22.
- (34) Mara, D. D.;(1996) Waste Stabilization Ponds: Effluent Quality Requirements and Implications for Process Design. *Water Sci. Technol.* **33** [7], 23–31.
- (35) Stone, D. L.;(1993) *Biotechnology for the Treatment of Hazardous Waste*, 1st ed.; Stone, D. L., Ed.; Lewis Publishers: Boca Raton, Florida.
- (36) Domènech, X.; Jardim, W. F.; Litter, M. I.;(2001) Procesos Avanzados de Oxidación Para La Eliminación de Contaminantes. *Elimin. Contam. por Fotocatálisis Heterogénea* No. August 2016, 3–26.
- (37) Guidelines, T.; Bank, W.;(2013) Executive Summary. *New Dir. Youth Dev.* **2013** [140], 5–8.
- (38) de la Noue, J.; de Pauw, N.;(1988) The Potential of Microalgal Biotechnology: A Review of Production and Uses of Microalgae. *Biotechnol. Adv.* **6** [4], 725–770.
- (39) Feng, Y.; Li, C.; Zhang, D.;(2011) Lipid Production of Chlorella Vulgaris Cultured in Artificial Wastewater Medium. *Bioresour. Technol.* **102** [1], 101–105.
- (40) González, L. E.; Cañizares, R. O.; Baena, S.;(1997) Efficiency of Ammonia and Phosphorus Removal from a Colombian Agroindustrial Wastewater by the Microalgae Chlorella Vulgaris and Scenedesmus Dimorphus. *Bioresour. Technol.* **60** [3], 259–262.
- (41) Econom, D. E.;(2010) *NORMA MEXICANA NMX-AA-087-SCFI-2010 ANÁLISIS DE AGUA - EVALUACIÓN DE TOXICIDAD AGUDA CON Daphnia Magna , Straus (Crustacea - Cladocera) - MÉTODO DE PRUEBA (CANCELA A LA NMX-AA-087-SCFI -1995). WATER ANALYSIS – ACUTE TOXICITY EVALUATION WITH Daphnia Ma.*
- (42) Le, N.; Guerra, P. T.; Zamudio, V.; Mart, L.; Rodr, C.; Guerra, R. S. T.; Formulaciones, F.; Baculovirus, G. D. E.; Combinaci, E. N.; Abrillantadores, C. O. N.; et al.;(2006) *Ciencia UANL. Cienc. UANL* **IX**, 149–156.
- (43) Silveira-Font, Y.; Liliana, G.-L.; Kufundala- Wemba, M.; Salazar-Hernández, D.; Ortega-Díaz, Y.;(2018) Variación de La Composición de Pigmentos de Chlorella Vulgaris Beijerinck , Con La Aplicación Del Campo Magnético Estático. **30** [1].

- (44) Chacon, C.; Andrade, C.; Cardenas, C.; Araujo, I.; Morales, E.;(2004) USO DE *Chlorella* Sp. Y *Scenedesmus* Sp. EN LA REMOCIÓN DE NITRÓGENO, FÓSFORO Y DQO DE AGUAS RESIDUALES URBANAS DE MARACAIBO, VENEZUELA. *Boletín del Cent. Investig. Biológicas* **3** [2], 1–13.
- (45) García-Gozalbes, C. C.; Arbib, Z.; Perales-Vargas-Machuca, J. A.;(2015) Cinéticas de Crecimiento y Consumo de Nutrientes de Microalgas En Aguas Residuales Urbanas Con Diferentes Niveles de Tratamiento. *Tecnol. y Ciencias del Agua* **6** [1], 49–68.
- (46) Rodriguez, T.; Botelho, D.; Cleto, E.;(2008) Tratamiento de Efluentes Industriales de Naturaleza Recalcitrante Usando Ozono, Peróxido de Hidrógeno y Radiación Ultravioleta. *Rev. Fac. Ing.* No. 46, 24–38.
- (47) Lado, B. H.; Yousef, A. E.;(2002) Alternative Food-Preservation Technologies: Efficacy and Mechanisms. *Microbes Infect.* **4** [4], 433–440.
- (48) Wang, W. L.; Zhang, X.; Wu, Q. Y.; Du, Y.; Hu, H. Y.;(2017) Degradation of Natural Organic Matter by UV/Chlorine Oxidation: Molecular Decomposition, Formation of Oxidation Byproducts and Cytotoxicity. *Water Res.* **124**, 251–258.
- (49) H. B. Wright y W. L. Cairns;(1996) DESINFECCION DE AGUA POR MEDIO DE LUZ ULTRAVIOLETA H. B. Wright y W. L. Cairns Trojan Technologies Inc. 3020 Gore Road, London, Ontario, Canada N5V 4T7. *Trojan Technol. Inc.* **4**, 1–28.
- (50) Pereira, A.; Santos, A.; Tação, M.; Alves, A.; Henriques, I.; Correia, A.;(2013) Genetic Diversity and Antimicrobial Resistance of *Escherichia Coli* from Tagus Estuary (Portugal). *Sci. Total Environ.* **461–462**, 65–71.
- (51) Fookes, M.; Schroeder, G. N.; Langridge, G. C.; Blondel, C. J.; Mammina, C.; Connor, T. R.; Seth-Smith, H.; Vernikos, G. S.; Robinson, K. S.; Sanders, M.; et al.;(2011) *Salmonella* Bongori Provides Insights into the Evolution of the *Salmonellae*. *PLoS Pathog.* **7** [8].
- (52) Soyer, Y.; Orsi, R. H.; Rodriguez-Rivera, L. D.; Sun, Q.; Wiedmann, M.;(2009) Genome Wide Evolutionary Analyses Reveal Serotype Specific Patterns of Positive Selection in Selected *Salmonella* Serotypes. *BMC Evol. Biol.* **9** [1], 1–18.
- (53) Odjadjare, E. C.; Olaniran, A. O.;(2015) Prevalence of Antimicrobial Resistant and Virulent *Salmonella* Spp. in Treated Effluent and Receiving Aquatic Milieu of Wastewater Treatment Plants in Durban, South Africa. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **12** [8], 9692–9713.
- (54) Mattock, E.; Blocker, A. J.;(2017) How Do the Virulence Factors of *Shigella* Work Together to Cause Disease? *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **7** [March], 1–24.
- (55) Pant, A.; Mittal, A. K.;(2008) New Protocol for the Enumeration of *Salmonella* and *Shigella* from Wastewater. *J. Environ. Eng.* No. Marzo, 222–226.
- (56) Villarroel, D. M.; Romero González, L.; Brito, M.; Yndira Ramos-Villarroel, A.;(2014) Luz Ultravioleta: Inactivación Microbiana En Frutas Ultraviolet Light: Microbial Inactivation on

Fruits. *Univ. Oriente, Venez.* **27** [3], 454–469.

- (57) Marcy, J. E.;(2003) Response of Salmonella and Escherichia Coli O157 : H7 to UV Energy. *J. Food Prot.* **66** [6], 1071–1073.
- (58) Seidei, H. J.; Weber, L.; Barthel, E.:(1992) Hematological Toxicity of Tetrachloroethylene in Mice. 228–230.
- (59) Tabernacka, A.; Zborowska, E.:(2012) Trichloroethylene and Tetrachloroethylene Elimination from the Air by Means of a Hybrid Bioreactor with Immobilized Biomass. *J. Biosci. Bioeng.* **114** [3], 318–324.
- (60) Kalyanaraman, B.; Kispert, L. D.; Atwood, J. L.:(1976) Disordered Crystal Structure of Chlorodifluoroacetamide. *J. Cryst. Mol. Struct.* **6** [6], 311–316.
- (61) Mikelman, S.; Mardirossian, N.; Gnegy, M. E.:(2017) Tamoxifen and Amphetamine Abuse: Are There Therapeutic Possibilities? *J. Chem. Neuroanat.* **83–84**, 50–58.
- (62) Jaafar, F. M.; Osman, C. P.; Ismail, N. H.; Awang, K.:(2007) Analysis of Essential Oils of Leaves, Stems, Flowers and Rhizomes of Etlingera Elatior (Jack) R.M.Smith. *Malaysian J. Anal. Sci.* **11** [1], 267–273.
- (63) Kamińska, A.; Pardyak, L.; Marek, S.; Górowska-Wójtowicz, E.; Kotula-Balak, M.; Bilińska, B.; Hejmej, A.:(2018) Bisphenol A and Dibutyl Phthalate Affect the Expression of Juxtacrine Signaling Factors in Rat Testis. *Chemosphere* **199**, 182–190.
- (64) Kumar, M.; Wadhwa, R.; Kothari, P.; Trivedi, R.; Vohora, D.:(2018) Differential Effects of Serotonin Reuptake Inhibitors Fluoxetine and Escitalopram on Bone Markers and Microarchitecture in Wistar Rats. *Eur. J. Pharmacol.* **825**, 57–62.
- (65) Walther, D.; Platzer, B.; Maurer, G.:(1992) High-Pressure (Vapour + Liquid) Equilibria of (Carbon Dioxide + Methylbenzene or 1,2-Dimethylbenzene or 1,3-Dimethylbenzene or 1,4-Dimethylbenzene) at Temperatures between 313 K and 393 K and Pressures up to 17.3 MPa. *J. Chem. Thermodyn.* **24** [4], 387–399.
- (66) Abdel daiem, M. M.; Rivera-Utrilla, J.; Ocampo-Pérez, R.; Méndez-Díaz, J. D.; Sánchez-Polo, M.:(2012) Environmental Impact of Phthalic Acid Esters and Their Removal from Water and Sediments by Different Technologies - A Review. *J. Environ. Manage.* **109**, 164–178.
- (67) Romanowski, G.; Kira, J.:(2017) Synthesis, Characterization and Catalytic Activity of Dioxidomolybdenum(VI) Complexes with Tridentate Schiff Bases Derived from 1R,2S(-)-Norephedrine. *Polyhedron* **134**, 50–58.
- (68) Valente, F.; Bysell, H.; Simoni, E.; Boge, L.; Eriksson, M.; Martini, A.; Astolfi, L.:(2018) Evaluation of Toxicity of Glycerol Monooleate Nanoparticles on PC12 Cell Line. *Int. J. Pharm.* **539** [1–2], 23–30.
- (69) Bondock, S.; Fadaly, W.; Metwally, M. A.:(2010) Synthesis and Antimicrobial Activity of

Some New Thiazole, Thiophene and Pyrazole Derivatives Containing Benzothiazole Moiety. *Eur. J. Med. Chem.* **45** [9], 3692–3701.

- (70) Sellaoui, L.; Knani, S.; Erto, A.; Hachicha, M. A.; Ben Lamine, A.;(2016) Equilibrium Isotherm Simulation of Tetrachlorethylene on Activated Carbon Using the Double Layer Model with Two Energies: Steric and Energetic Interpretations. *Fluid Phase Equilib.* **408**, 259–264.
- (71) Martín-López, M.; Muela, A. T.; Cavas, M.; Navarro, J. F.;(2018) Effects of Para-Methoxyamphetamine (PMA) on Agonistic Encounters between Male Mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **167** [February], 9–16.
- (72) Nonadecan-2-amine | C19H41N - PubChem <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2-Aminononadecane> (accessed Feb 25, 2018).
- (73) Park, J. Y.; Lee, S. H.; Kim, K. R.; Park, J. B.; Oh, D. K.;(2015) Production of 13S-Hydroxy-9(Z)-Octadecenoic Acid from Linoleic Acid by Whole Recombinant Cells Expressing Linoleate 13-Hydratase from *Lactobacillus Acidophilus*. *J. Biotechnol.* **208**, 1–10.
- (74) Gil, S.; Láazaro, M. A.; Parra, M.;(1996) Sex Pheromone of *Chilo Suppressalis*: Efficient Syntheses of (Z)-11-Hexadecenal, (Z)-13-Octadecenal And (Z)-9-Hexadecenal. *Synth. Commun.* **26** [12], 2329–2340.
- (75) Bajaj, A.; John, C.; Kaur, S.; Middha, D.;(2016) Cathine and Alcohol Involved Fatality: A Rare Case Report with a Brief Review of the Literature. *Egypt. J. Forensic Sci.* **6** [4], 538–541.
- (76) Legrini, O.; Oliveros, E.; Braun, A. M.;(1993) Photochemical Processes for Water Treatment. *Chem. Rev.* **93** [2], 671–698.
- (77) Barzegar, G.; Jorfi, S.; Zarezade, V.; Khatebasreh, M.; Mehdipour, F.; Ghanbari, F.;(2018) 4-Chlorophenol Degradation Using Ultrasound/Peroxymonosulfate/Nanoscale Zero Valent Iron: Reusability, Identification of Degradation Intermediates and Potential Application for Real Wastewater. *Chemosphere* **201**, 370–379.
- (78) Chemical Structure of 3-Methyl-1-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)butan-2-one - C7H11N3O | Mol-Instincts <https://www.molinstincts.com/chemical-structure/3-Methyl-1-1H-1-2-4-triazol-1-yl-butan-2-one-cstr-CT1001623740.html> (accessed Feb 25, 2018).
- (79) Kurzer, F.; Wilkinson, M.;(1970) The Chemistry of Carbohydrazide and Thiocarbohydrazide. *Chem. Rev.* **70** [1], 111–149.
- (80) Kwon, O. Y.; Jeong, S. Y.; Suh, J. K.; Ryu, B. H.; Lee, J. M.;(1996) Effects of Organic Solvents in the Intercalation of Octylamine into H-Magadiite. *J. Colloid Interface Sci.* **177** [2], 677–680.
- (81) Posada-Duque, J. A.; Cardona-Alzate, C. A.;(2010) Análisis de La Refinación de Glicerina Obtenida Como Coproducto En La Producción de Biodiesel. *Ing. y Univ.* **14** [1], 9–28.

- (82) Lingwood, D.; Simons, K.:(2010) Lipid Rafts As a Membrane-Organizing Principle. *Science (80-.).* **327** [5961], 46–50.
- (83) Adero, P. O.; Jarois, D. R.; Crich, D.:(2017) Hydrogenolytic Cleavage of Naphthylmethyl Ethers in the Presence of Sulfides. *Carbohydr. Res.* **449**, 11–16.
- (84) Islam, M. T.; De Alencar, M. V. O. B.; Da Conceição Machado, K.; Da Conceição Machado, K.; De Carvalho Melo-Cavalcante, A. A.; De Sousa, D. P.; De Freitas, R. M.:(2015) Phytol in a Pharma-Medico-Stance. *Chem. Biol. Interact.* **240**, 60–73.
- (85) Ma, Y. F.; Wang, H.; Xu, G. Y.; Liu, X. H.; Zhang, Y.; Fu, Y.:(2017) Selective Conversion of Furfural to Cyclopentanol over Cobalt Catalysts in One Step. *Chinese Chem. Lett.* **28** [6], 1153–1158.
- (86) Ignaczak, A.; Santos, E.; Schmickler, W.; da Costa, T. F.:(2017) Oxidation of Oxalic Acid on Boron-Doped Diamond Electrode in Acidic Solutions. *J. Electroanal. Chem.* No. August, 0–1.
- (87) Castada, H. Z.; Park, C.; Harper, W. J.; Barringer, S. A.:(2016) Suppression of Propanoic Acid, Acetic Acid and 3-Methylbutanoic Acid Production by Other Volatiles in a Swiss Cheese Curd Slurry System. *Int. Dairy J.* **54**, 29–32.
- (88) Rakoff, H.; Emken, E. A.:(1982) Bromide and Methyl 12-Oxo-C&- Or. **31**, 215–225.
- (89) Cioates Negut, C.; Stefan-Van Staden, R. I.; Moldoveanu, I.; Ungureanu, E. M.; Stanciu-Gavan, C.:(2015) New Stochastic Microsensors Based on Oleamides. *Electrochem. commun.* **51**, 98–102.
- (90) Jacobs, H. M.; Sant, K. E.; Basnet, A.; Williams, L. M.; Moss, J. B.; Timme-Laragy, A. R.:(2018) Embryonic Exposure to Mono(2-Ethylhexyl) Phthalate (MEHP) Disrupts Pancreatic Organogenesis in Zebrafish (*Danio Rerio*). *Chemosphere* **195**, 498–507.
- (91) SEMARNAT;(2005) NOM-074-ECOL-1994 METODO DE PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA CON DAPHNIA MAGNA STRAUS. *Diario Oficial de la Federación.* 2005, pp 1–21.
- (92) Leme, D. M.; Marin-Morales, M. A.:(2009) Allium Cepa Test in Environmental Monitoring: A Review on Its Application. *Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res.* **682** [1], 71–81.
- (93) Datta, S.; Singh, J.; Singh, J.; Singh, S.; Singh, S.:(2018) Assessment of Genotoxic Effects of Pesticide and Vermicompost Treated Soil with Allium Cepa Test. *Sustain. Environ. Res.* **28** [4], 171–178.
- (94) Liman, R.; Ciğerci, I. H.; Öztürk, N. S.:(2015) Determination of Genotoxic Effects of Imazethapyr Herbicide in Allium Cepa Root Cells by Mitotic Activity, Chromosome Aberration, and Comet Assay. *Pestic. Biochem. Physiol.* **118**, 38–42.
- (95) Hoshina, M. M.; Marin-Morales, M. A.:(2009) Micronucleus and Chromosome Aberrations Induced in Onion (*Allium Cepa*) by a Petroleum Refinery Effluent and by River Water That

Receives This Effluent. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **72** [8], 2090–2095.

- (96) Rank, J.; Nielsen, M. H.;(1994) Evaluation of the Allium Anaphase-Telophase Test in Relation to Genotoxicity Screening of Industrial Wastewater. *Mutat. Res. Mutagen. Relat. Subj.* **312** [1], 17–24.
- (97) Walker, J. A.; Boreham, D. R.; Unrau, P.; Duncan, A. M. V.;(1996) Chromosome Content and Ultrastructure of Radiation-Induced Micronuclei. *Mutagenesis* **11** [5], 419–424.