

## **1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN**

### **1.1 Formulación del Problema**

Las operaciones hidrocarburíferas desarrolladas dentro del Oleoducto de Crudos Pesados OCP, implican una operación y monitoreo permanente a lo largo de todos los tramos del oleoducto de crudos pesados, por parte del personal que labora en esta institución.

Tomando en cuenta esta necesidad, OCP crea campamentos en los puntos de monitoreo y estaciones de bombeo a lo largo del trayecto del oleoducto, a fin de que, tanto el personal de OCP como los miembros de la fuerza militar que apoyan las operaciones, vivan dentro del área de trabajo lo cual es necesario para las operaciones permanentes que el oleoducto requiere.

El campamento de la estación Páramo PS4 de OCP, constituye un conjunto integral de unidades habitacionales (Dormitorios, baños, cocina, comedores, sala de entretenimiento, lavanderías, bodegas, canchas deportivas), que brinda el alojamiento con todas las comodidades y servicios tanto para el personal de OCP como también al personal militar.

Debido a la ubicación remota del campamento mencionado, se debe contar con un mecanismo alternativo para el tratamiento de las descargas líquidas (aguas negras y grises) que se generan como consecuencia de la actividad humana dentro del campamento; este mecanismo debe caracterizarse por ser eficiente en la remoción y/o transformación de contaminantes además de ser económicamente rentable.

En el caso del campamento de la estación Páramo PS4 de OCP se ha optado por implementar un sistema de tratamiento de aguas por lechos filtrantes, este sistema también es conocido como humedales artificiales de flujo subsuperficial.

El presente proyecto pretende lograr una optimización de este sistema de tratamiento aplicando la técnica de Bioadición de la Rizósfera (Ryzosphere

Bioaugmentation) empleando microorganismos nativos de la zona, seleccionados específicamente por su capacidad de degradar los contaminantes presentes en el influente, a fin de lograr un cumplimiento de la normativa legal ambiental vigente en nuestro país.

## 1.2 Justificación del Problema

Se ha realizado un diagnóstico preliminar del estado en el que se encuentran los lechos de tratamiento de aguas negras y grises del campamento Páramo PS4 de OCP, donde se constató que no existe crecimiento de la especie vegetal empleada Vetiver (*Chrysopogon zizanioides*) aplicada actualmente en los mencionados lechos debido a la falta de adaptación de esta especie al clima local y a las condiciones imperantes en el lecho sobre el cual se desarrolla, lo que ha repercutido en la eficiencia del tratamiento.

Desde el punto de vista morfológico, se ha realizado un seguimiento del crecimiento de las plantas y se observa que existe un crecimiento radicular pero no un desarrollo normal en sus tallos y hojas. La Figura 1.1 muestra una comparación del estado actual de las plantas empleadas en los lechos.



*Figura 1.1.- Izquierda: Estado actual de las plantas de Vetiver (*Chrysopogon zizanioides*) aplicadas en los lechos filtrantes de la estación Páramo PS4; Derecha: Plantas de Vetiver (*Chrysopogon zizanioides*) perfectamente desarrolladas en los lechos filtrantes en un campamento de OCP en Baeza, Napo. Foto: G. Arévalo, 2008*

El monitoreo de la descarga ha evidenciado un aumento paulatino en la demanda química del oxígeno, DQO (septiembre´06 = 115, noviembre´07=150, diciembre´06= 130, marzo´07= 143, junio´07 =101) mg/l (OCP, 2007).

Lo que confirma la falta de eficiencia de este sistema. En el mes de junio del 2007 el monitoreo de cumplimiento legal reporta un valor de 101 mg/l de DQO, encontrándose fuera de los límites permisibles establecidos en el RAOH 1215 (OCP, 2007).

El problema puede ser abordado desde dos enfoques diferentes pero a la vez muy relacionados entre sí, en primer lugar, la planta empleada en el sistema de tratamiento de aguas negras y grises no posee la capacidad de soportar las condiciones climáticas altamente cambiantes de la zona de Papallacta, entonces una primera solución es investigar alguna alternativa de especie vegetal que se pueda aplicar de manera eficiente en el tratamiento, esto forma parte de un proyecto que será desarrollado de forma paralela y que evaluará la capacidad de adaptación de las especies *Eleocharis elegans*, *Carex lemanianna* y *Cypera bipartitus*.

En segundo lugar, tomando en cuenta el hecho de que existe un crecimiento radicular de la planta pero no logra alcanzar un desarrollo completo debido a la falta de microorganismos que colonizan la rizósfera y la consecuente falta de biodisponibilidad de los contaminantes para ser absorbidos por la planta; esto constituye un problema crucial en este tipo de tratamiento, cuya solución involucra la aplicación de microorganismos que colonicen la rizósfera de la planta a ser empleada (Bioadición de la Rizósfera) en el tratamiento, los mismos que deben ser eficientes tanto en la capacidad de colonizar la rizósfera de la planta bajo las condiciones imperantes en los lechos, así como también en su capacidad natural para degradar los contaminantes presentes en el influente.

## **1.3 Objetivos**

### **1.3.1 Objetivo General**

Optimizar el sistema de tratamiento de lechos filtrantes para aguas negras y grises en la estación Páramo PS4 mediante la bioadición de microorganismos rizosféricos nativos.

### **1.3.2 Objetivos Específicos**

- Realizar un análisis bioquímico del agua que ingresa a los lechos luego del proceso de sedimentación.
- Ejecutar un análisis comparativo de la población microbiana inicial de la rizósfera de las plantas presentes en los lechos *Chrysopogon zizanioides* y las plantas a usarse como alternativa: *Eleocharis elegans*, *Carex lemanianna* y *Cypera bipartitus*.
- Aislar las cepas de microorganismos rizosféricos mejor adaptadas a las condiciones de los lechos filtrantes y realizar una proliferación masiva.
- Inocular las cepas seleccionadas en la rizósfera de las plantas.
- Realizar un análisis bioquímico del agua al final del tratamiento.

## **1.4 MARCO TEÓRICO**

### **1.4.1 Fitorremediación**

En las últimas décadas del siglo XX surgieron tecnologías basadas en el empleo de organismos vivos para descontaminar emplazamientos contaminados y recuperar los ecosistemas afectados. Cuando estas tecnologías se basan en el uso de plantas, globalmente reciben el nombre de fitorremediación (Carpena, 2007).

Se define como el uso de plantas verdes para eliminar los contaminantes del entorno o para reducir su peligrosidad (Salt et al., 1998).

La fitorremediación de suelos contaminados se basa en el uso conjunto de plantas, enmiendas del suelo y técnicas agronómicas para eliminar, retener, o disminuir la toxicidad de los contaminantes del suelo (Chaney, et al., 1997). Este grupo de fitotecnologías reúne un gran número de ventajas, especialmente la limpieza y la economía; no utilizan reactivos químicos peligrosos, ni afectan negativamente a la estructura del suelo, sólo aplican prácticas agrícolas comunes; además, el proceso se realiza 'in situ' evitando costosos transportes (Cunningham, et al., 1995).

Estas fitotecnologías se pueden aplicar tanto a contaminantes orgánicos como inorgánicos, presentes en sustratos sólidos, líquidos o en el aire. Según Carpena, 2007; se distinguen:

- Fitoextracción: uso de plantas acumuladoras de elementos tóxicos o compuestos orgánicos para retirarlos del suelo mediante su absorción y concentración en las partes cosechables.
- Fitoestabilización: uso de plantas para reducir la biodisponibilidad de los contaminantes en el entorno, mejorando las propiedades físicas y químicas del medio.
- Fitoimmobilización: uso de las raíces de las plantas para la fijación o inmovilización de los contaminantes en el suelo.
- Junto con la anterior son técnicas de contención.
- Fitovolatilización: uso de plantas para eliminar los contaminantes del medio mediante su volatilización, y para eliminar contaminantes del aire.
- Fitodegradación: uso de plantas y microorganismos asociados para degradar contaminantes orgánicos.
- Rizofiltración: uso de raíces para absorber y adsorber contaminantes del agua y de otros efluentes acuosos.

La importancia de la Rizofiltración y los microorganismos del suelo es claramente evidenciado en la naturaleza, donde los nutrientes que la planta necesita, pasan directamente a un ciclo de materia orgánica, solubilización de metales por medio de exudados radicales y la formación de relaciones simbióticas con hongos y bacterias. Hasta la actualidad, la importancia de los procesos de la rizósfera relacionados directamente con la nutrición de la planta no han sido mayoritariamente considerados en agricultura o técnicas de Fitorremediación (García, 2002).

#### **1.4.2 Humedales Artificiales**

La importancia de los humedales ha variado con el tiempo. En el período carbonífero, es decir, hace 350 millones de años, cuando predominaban los ambientes pantanosos, los humedales produjeron y conservaron muchos combustibles fósiles (carbón y petróleo) de los que hoy dependemos. El progreso del conocimiento científico de los humedales ha puesto en evidencia unos bienes y servicios más sutiles y han sido descritos a la vez como los riñones del medio natural, a causa de las funciones que pueden desempeñar en los ciclos hidrológicos y químicos, y como supermercados biológicos, en razón de las extensas redes alimentarias y la rica diversidad biológica (Llagas y Gómez, 2006).

El uso de humedales artificiales constituye un tratamiento alternativo rentable. Mediante la implementación de un humedal se asegura el tratamiento óptimo de aguas de desecho. Para el tratamiento de aguas municipales, el uso de humedales artificiales ha sido aplicado en varias actividades industriales (EPA, 1988).

#### **1.4.3 Lechos Filtrantes o Humedales Artificiales de Flujo Subsuperficial**

Los lechos filtrantes conocidos también como humedales artificiales de flujo subsuperficial se caracterizan porque su lecho contiene un medio poroso en el cual se encuentran plantadas macrófitas emergentes. Este tipo de humedales se diseñan de tal manera que el nivel del agua se encuentre por

debajo del nivel del medio poroso con el fin de minimizar los olores, la atracción de vectores y los efectos negativos sobre la salud pública de las poblaciones aledañas al humedal (EPA, 2000).

Los humedales artificiales de flujo Subsuperficial presentan algunas ventajas en comparación con otros sistemas de tratamiento de aguas residuales, dentro de las que se pueden mencionar: un bajo costo de construcción y operación; fácil operación; mínima o nula necesidad de equipos mecánicos, electricidad u operadores calificados y nula producción de biosólidos o lodos residuales (EPA, 2000).

El diseño de un humedal artificial de flujo Subsuperficial se puede apreciar en la Figura 1.2.

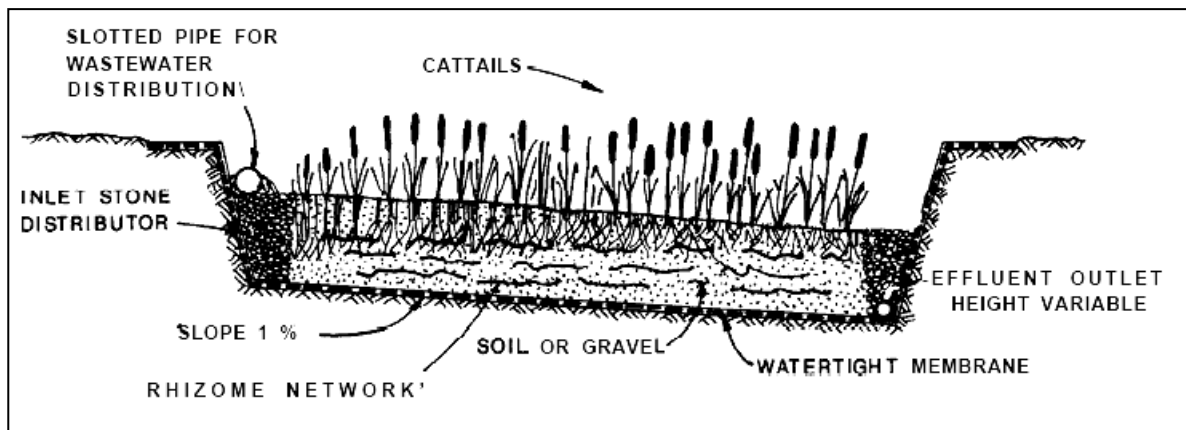


Figura 1.2.- sección transversal típica de un humedal artificial de flujo Subsuperficial.

Fuente: García, 2002.

#### 1.4.4 Microbiología del Suelo

La microbiología del suelo no es una disciplina pura ya que su origen puede establecerse en una combinación de conocimientos de bacteriología, micología y edafología además de bioquímica y fitopatología.

Estas disciplinas se entrelazan para formar la microbiología del suelo y se debe estar familiarizado en cierta medida con sus principios para poder entender e interpretar todos los fenómenos que suceden dentro del suelo y el impacto que tienen dentro del medio ambiente.

En el suelo coexisten una variedad de organismos que realizan muy diversas funciones que ejercen una influencia benéfica o perjudicial sobre el hombre y el medio ambiente entre los cuales podemos citar a los hongos, bacterias, actinomicetos, algas, protozoos, nematodos y virus.

Para realizar un análisis de los microorganismos edáficos es necesario llevar a cabo una serie de técnicas básicas y experimentales que nos permitan conocer la morfología, hábitos, fisiología y en general su biología así como también su extracción y aislamiento (Sánchez, 2004).

El número de bacterias en el suelo es grande pero los individuos son pequeños y constituyen menos de la mitad de la masa celular microbiana total. Taxonómicamente las bacterias se ubican según el Manual de Bergey (1988) en grupos donde se consideran sus características fisiológicas, nutricionales y metabólicas, así como también el tipo de energía que utilizan para realizar su metabolismo como podría ser el uso de carbohidratos, nitrógeno, etc.

La morfología celular también sirve para caracterizar a las bacterias, las cuales pueden ser bacilos, cocos y espirilos (poco comunes en el suelo). Algunos bacilos poseen la capacidad de generar endosporas que permanecen en estado latente en condiciones adversas, otras especies poseen estructuras que también se toman en cuenta como son la presencia y posición de los flagelos.

La cantidad y tipo de bacterias están determinadas en gran medida por el tipo de suelo, humedad, aireación, temperatura, pH, cantidad de materia orgánica, profundidad, prácticas de cultivo y estación de año. Por lo general, el número de bacterias es mayor en zonas cultivadas que en zonas vírgenes, ya que el cultivo favorece las condiciones para la proliferación bacteriana en la matriz de la rizósfera de los vegetales (Alexander, 1990; Sprent, 1990).

Los géneros de bacterias que aparecen comúnmente en las placas de agar con suspensión de suelo diluido son *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Sarcina*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Xantomonas*.



Además de *Azotobacter*, *Nitrobacter*, *Nitrosoma*, *Aerobacter*, *Azospirillum* y *Rizhobium*.

Los géneros *Bacillus* y *Clostridium* son formadores de endosporas. De todos los géneros antes mencionados que aparecen en las placas de agar son del 5-60% de *Artrobacter*, del 7-67% de *Bacillus*, del 3-15% de *Pseudomonas*, 20% de *Agrobacterium* y menos del 5% lo representan otros géneros (Sánchez, 2004).

#### **1.4.5 Interacciones microbianas que influyen en la nutrición de la planta**

Los microorganismos poseen numerosos efectos tanto directos como indirectos en la nutrición de la planta, incluyendo la solubilización directa de nutrientes requeridos para el crecimiento de la planta, aumento de la mineralización de la materia orgánica en la rizósfera y efectos indirectos sobre el crecimiento radicular (Schröder, 2003).

Se ha demostrado que las raíces de plantas inoculadas con microorganismos de la rizósfera captan más fósforo a partir de fosfatos de calcio solubles. Microorganismos encontrados en la rizósfera son especialmente efectivos y algunas cepas de *Pseudomonas fluorescens* disuelven un amplio rango de complejos de fósforo inorgánico, incluso se puede aumentar la biodisponibilidad de fósforo a partir de fuentes rocosas (Loneragan, 1995).

Otra clave de la interacción de los microorganismos con las plantas involucra la simbiosis con bacterias fijadoras de nitrógeno que contribuyen a la disponibilidad de nitrógeno y fósforo para la nutrición.

Se estima que los microorganismos soportados por la rizósfera constituyen una tercera parte de la biomasa total en la raíz. El flujo de carbono, partiendo desde la fotosíntesis, implementa una demanda de nutrientes minerales por parte de toda la comunidad biológica del suelo que requiere la mineralización de nutrientes contenidos en la materia orgánica del suelo

además de los minerales propios del suelo. Esto puede ser especulado en un ecosistema que funciona óptimamente, donde los nutrientes son movilizados en función de la demanda de la planta previniendo de esta manera la pérdida por factores como volatilización, entre otros (Schröder, 2003).

#### **1.4.6 Rizorremediación**

El término rizósfera fue usado primeramente por Hiltner en 1904 asignando la siguiente definición: “Es el volumen de suelo que recibe influencia de la raíz”. Esta delgada capa de suelo ha sido estudiada intensamente en los últimos años; el principal aporte es reconocer a la rizósfera como un complejo ejemplo de equilibrio ecológico que se establece entre la flora microbiana y las raíces de las plantas gracias a las relaciones biológicas de tipo sinérgico o comensalismo. La composición inorgánica del suelo también influye sobre la planta y la flora microbiana. Del tipo de suelo dependen el contenido de humedad y la aireación, que a su vez influyen notablemente en la colonización microbiana. El equilibrio ecológico manifiesto en la rizósfera corresponde a un equilibrio de los ciclos geobiológicos en esta zona (Pérez, 2002).

Las enzimas que la planta produce establecen la degradación de contaminantes durante la fitorremediación, sin embargo, durante una atenuación natural o bioadición, la población microbiológica nativa es la que realiza la degradación. En muchos de estos estudios, una importante contribución a la degradación de contaminante es adscrita a la población microbiana presente en la rizósfera de plantas usadas durante la fitorremediación o plantas que han emergido de manera natural sobre un área contaminada. Esta contribución de la población rizo-microbiana es conocida como rizorremediación (Anderson, 1993).

En muchos casos, los microorganismos de la rizósfera son los principales y mayoritarios contribuyentes al proceso de degradación. Una planta puede ser considerada como un sistema de tratamiento a manera de una bomba biológica dependiente del sol, atrayendo agua mediante su sistema radicular, acumulando contaminantes solubles en la rizósfera y concluyendo con la translocación y/o degradación del contaminante. Sin embargo, la

importancia de la comunidad de la rizósfera, en la degradación del contaminante, está siendo reconocida aunque existe un conocimiento reducido sobre la composición exacta de esta comunidad capaz de degradar (Schröder, 2003).

#### **1.4.7 Bioadición de la rizósfera**

Las plantas usualmente no poseen una ruta metabólica completa capaz de llevar a cabo una degradación de contaminantes, es más, al tratar de realizar este proceso, se pueden producir compuestos aún más tóxicos. En adición, los organismos específicos (nativos o genéticamente modificados con propiedades degradadoras) son usados para la biodegradación de un medio ambiente contaminado (Jaanis, 2007).

Los primeros estudios sobre la degradación de contaminantes en la rizósfera fueron principalmente enfocados en la degradación de pesticidas y herbicidas. Estos estudios sugieren que las plantas se hallan protegidas contra estos compuestos gracias a la existencia de bacterias degradadoras. En la actualidad, muchos reportes tratan sobre la degradación de compuestos orgánicos peligrosos tales como TCE y PBC.

En muchos de esos reportes la composición de la población microbiana no ha sido analizada en detalle, además, la mayoría de los reportes no posee ninguna información sobre la sobrevivencia, proliferación y actividad de esta población microbiana (Jaanis, 2007).

Estudios de las plantas más empleadas como sistema de rizadorremediación muestran que las especies más efectivas son las leguminosas y pastos, esto se debe a que grandes cantidades de especies microbianas pueden fácilmente colonizar su sistema radicular que, en estos vegetales, es amplio y muy ramificado.

El éxito también depende de factores tales como el metabolismo primario y secundario y el establecimiento, supervivencia y relaciones ecológicas con otros organismos. Las raíces de las plantas poseen también la

capacidad física de facilitar la aireación del suelo, dando un hábitat ideal para microorganismos aerobios. El uso combinado de plantas y microorganismos, constituyen un gran avance en la generación de un incremento en el número de la población microbiana así como también, en la actividad metabólica general de la rizósfera. Este factor también puede establecer una notable mejora en las propiedades físicas y químicas del suelo contaminado y un gran aumento del contacto entre bacterias asociadas con la raíz y los contaminantes presentes en el medio (Kuiper, 2003).

Durante varias décadas, varias investigaciones se han realizado en el uso de inóculos microbiológicos para implementar la nutrición de las plantas, incluyendo el uso de bacterias solubilizadoras de fósforo, inóculos de *Rizobium* y micorrizas. La posibilidad del uso de bacterias genéticamente modificadas aptas para generar una respuesta ante la presencia de componentes específicos en la rizósfera es una novedosa área de investigación con gran potencial para el manejo de sistemas planta-microorganismo con una elevada eficiencia en la captación de nutrientes.

La idea de bioadición es que las capacidades metabólicas de la comunidad microbiológica nativa pueda ser incrementada por una diversidad de microorganismos exógenos para alcanzar un proceso más eficiente de biodegradación (Jaanis, 2007).

Uno de los mayores desafíos para usar bacterias naturales o modificadas genéticamente, ha sido el desarrollo de métodos de inoculación que puedan asegurar la distribución uniforme de bacterias activas en el suelo capaces de competir con los microorganismos nativos. Esto constituye también un problema para la aplicación de microorganismos para biorremediación mediante la adición de microorganismos benéficos que generan varios factores de crecimiento capaces de aumentar la generación de raíces y la consecuente captación mineral (Preetha, 2008).

Recientemente, nuevas tecnologías han sido desarrolladas para permitir el cultivo in situ de bacterias en fermentadores automatizados dispuestos en el campo, el cultivo puede ser inyectado en el agua de irrigación a manera de una

aplicación continua. Esto repercute en varios de los problemas asociados con el costo de producción del inóculo así como también su transporte y almacenamiento (Kuiper, 2003).

Mediante la inundación repetitiva del suelo con la bacteria seleccionada, se puede asistir con la superación de la exclusión competitiva por las bacterias nativas que ocupan al mismo tiempo el nicho que va a ser usado por la bacteria seleccionada para determinada aplicación. Esta tecnología puede ser explorada para la aplicación en biocontrol y biorremediación, obtención de microorganismos que pueden ser aplicados para lograr un aumento de la población de bacterias benéficas en la nutrición de la planta y el crecimiento de la raíz, los cuales constituyen los problemas más comunes (Acero, 1997).

#### **1.4.8 Problemas asociados con la bioadición**

Estudios previos usualmente reportan que el número de los microorganismos exógenos decrece levemente después de la adición en un área determinada. Existen varias explicaciones para la muerte de los microorganismos introducidos, incluyendo factores de estrés biótico y abiótico. El estrés abiótico puede incluir fluctuaciones o temperaturas extremas, contenido de agua, pH y disponibilidad de nutrientes. Además, los microorganismos añadidos casi siempre enfrentan una competencia con los organismos nativos por los nutrientes limitados, así como también pueden existir relaciones antagonistas por medio de microorganismos productores de antibióticos y depredación por parte de protozoos y bacteriófagos (Terry, 2004).

También representa una dificultad la entrega del inoculante en el área designada. Esto no es problemático en suelos superficiales donde el inoculado puede ser mecánicamente incorporado dentro del suelo a tratar, pero en ambientes sub superficiales la inoculación directa puede llegar a ser difícil y hasta imposible. Tecnologías como el uso de una ultramicrobacteria, una bacteria con su superficie celular alterada y/o la adición de surfactantes pueden facilitar en gran medida el transporte a través de la matriz del suelo. La habilidad de distribuir el inoculante también depende de qué microorganismos se está usando. Los hongos, los cuales son mucho más largos que las

bacterias, son usualmente restringidos para aplicaciones superficiales mientras que las bacterias son más adaptables a aplicaciones superficiales y sub superficiales (Terry, 2004).

Se pueden mencionar varias tecnologías para lograr una optimización en técnicas de bioadición, incluyendo:

1. Nuevos métodos para incrementar la supervivencia de los microorganismos inoculados dentro de suelos contaminados.
2. El desarrollo de bacterias genéticamente modificadas con capacidad de remediación.
3. Uso de genes reporteros para monitorear la actividad y/o presencia de los organismos introducidos.
4. Uso de genes suicidas para controlar la dispersión de microorganismos genéticamente modificados.
5. Tecnologías basadas en un soporte vegetal para la entrega de microorganismos para remediación.

Varias técnicas diferentes han sido desarrolladas recientemente (Figura 1.3), pero los inoculantes microbianos han sido aplicados al suelo como organismos vivos contenidos en un medio de cultivo líquido o adjuntos a una matriz de transporte. Cuando se aplica el inoculante en un ambiente sólido granular como lo es el suelo, este puede ser considerado como un material de transporte mientras pueda proveer un nicho protector para el microorganismo introducido (Terry, 2004).

Las características ideales de un medio para inoculación incluyen:

1. Proveer un ambiente adecuado para la sobrevivencia y crecimiento resultando en una larga vida y aumentada actividad celular.
2. No ser tóxico para los microorganismos y el ambiente.

3. Permitir una fácil introducción dirigida de las células al lugar donde se llevará a cabo la degradación.

Investigaciones han demostrado que la pre esterilización de la matriz del inoculante puede incrementar la sobrevivencia de los microorganismos (Acero, 1997). Según resultados obtenidos por Van Dyke y Prosser también demostraron que la preincubación del inoculante en un medio estéril puede aumentar la sobrevivencia del mismo.

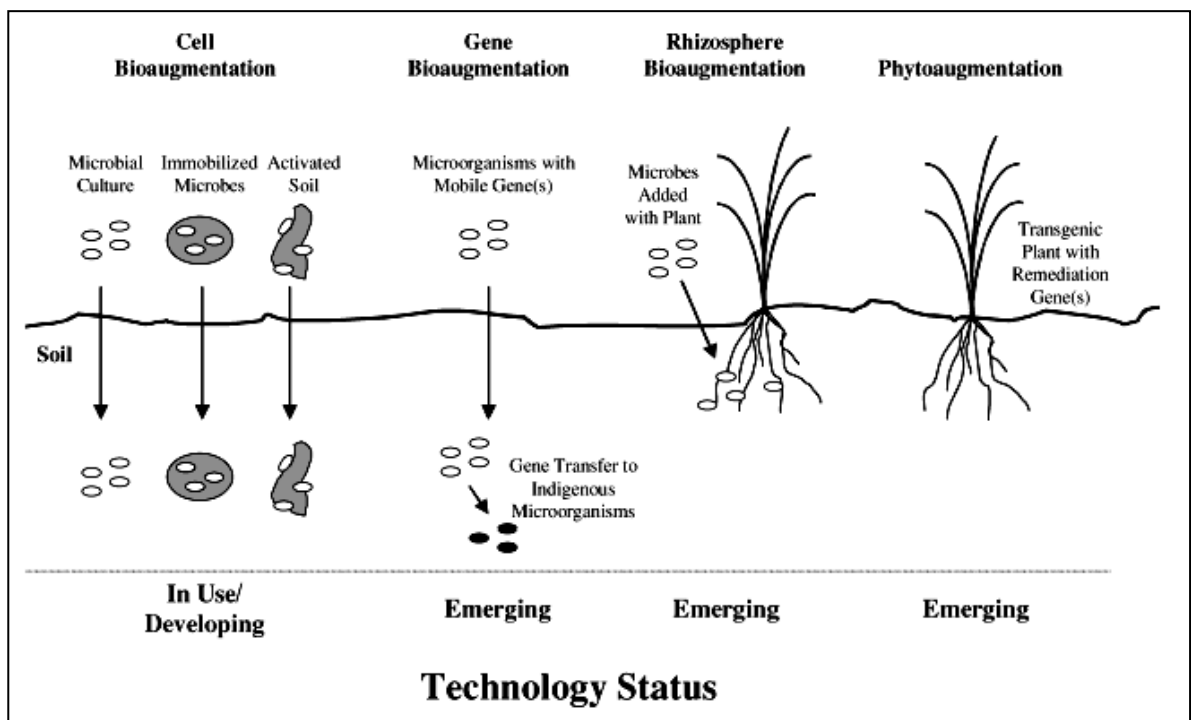


Figura 1.3.- resumen de las diferentes tecnologías de bioadición. Fuente: Terry, 2004

### 1.5 Sistema de Hipótesis

El número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en las especies vegetales y el nivel de adaptación de las colonias aisladas, no tendrán diferencias estadísticas significativas.

## 2. CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Fase de Campo

#### 2.1.1 Localización Geográfica

Estación Páramo PS4 Oleoducto de Crudos Pesados OCP, Papallacta, Napo Km 118. Coordenadas Planas: Lechos filtrantes campamento OCP PS4-STLF1 9959312 NORTE, 822435 ESTE. Altura 2862 m.s.n.m.

#### 2.1.2 Recolección y Tratamiento de las Muestras

Las muestras de raíces se extrajeron usando una pala de jardinería limpia para remover la tierra alrededor de la planta con el propósito de liberar la zona de la raíz, seguidamente se extrajo toda la planta desde la raíz, posteriormente la muestras se colocaron dentro de bolsas de plástico individuales con cierre hermético (Ver Figura 2.1). El transporte se realizo dentro de una caja térmica para evitar los cambios bruscos de temperatura.



*Figura 2.1.- Extracción de plantas de Vetiver (Chrysopogon zizanioides) del sistema de lechos filtrantes en la estación Páramo PS4 OCP. Foto: G. Arévalo, 2009.*



## 2.2 Fase de Laboratorio

### 2.2.1 Localización Geográfica

Toda la fase de laboratorio se realizó en los laboratorios de Agrobiotecnología del Instituto Agropecuario Superior Andino IASA I, Sangolquí. Latitud 0°23'4.86"S, Longitud 78°24'53.45"O.

### 2.2.2 Análisis de agua en el influente

A fin de determinar el estado del agua al ingreso del tratamiento, se realizaron análisis periódicos del agua determinando los parámetros mostrados en el Cuadro 2.1. Los análisis fueron realizados por Laboratorios ANNCY-Quito.

*Cuadro 2.1.- Parámetros determinados en el análisis de agua a la entrada del sistema de lechos filtrantes.*

Ensayo TABLA 5 D.1215	Métodos Referencia - Laboratorio	Unidades	Límite de Cuantificación
pH	APHA 4500 H+B - PEE/ANNCY/48	Unid. pH	
Demanda Química de Oxígeno	APHA 5220 D - PEE/ANNCY/03	mg/l	30
Coliformes Fecales*	APHA 9223 B - PEE/ANNCY/76	NMP/100ml	1
Cloro Libre Residual	APHA 4500 Cl-G - PEE/ANNCY/16	mg/l	0.05

Ensayo	Métodos Referencia - Laboratorio	Unidades	Límite de Cuantificación
Conductividad	APHA 2510 B - PEE/ANNCY/18	µs/cm	3.0
Nitratos*	HACH 8171 - PEE/ANNCY/24	mg/l NO3	2.2
Nitrógeno Total*	HACH 8075 - PEE/ANNCY/56	mg/l NTK	2.0
Sólidos Totales	APHA 2540 B - PEE/ANNCY/11	mg/l	20
Coliformes Totales*	APHA 9223 B - PEE/ANNCY/45	NMP/100ml	1

### 2.2.3 Análisis de la población microbiológica de la rizósfera

Esta fase consiste en un conteo comparativo de las unidades formadoras de colonias contenidas en un gramo de suelo rizosférico (UFC/g) de las especies vegetales que se analizaron. El proceso global se resume en la Figura 2.2.

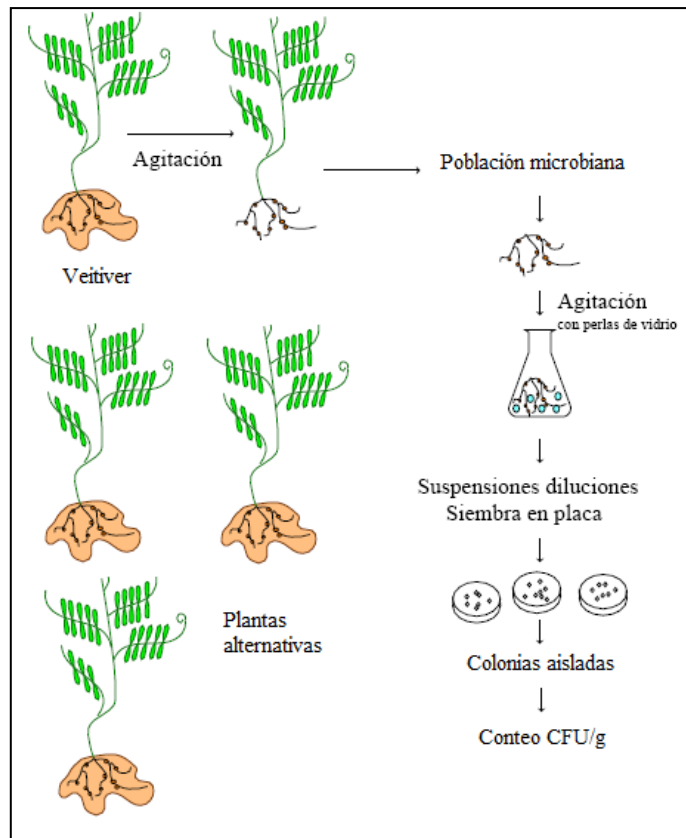
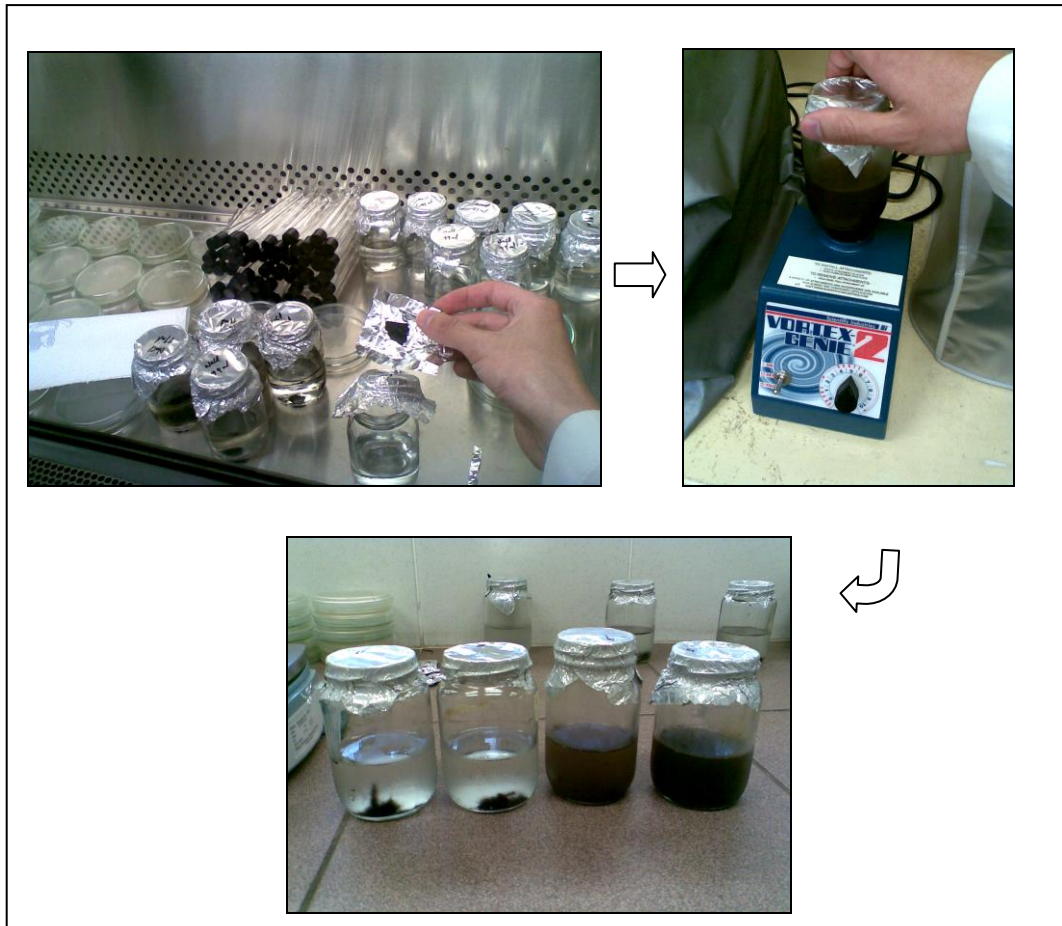


Figura 2.2.- Esquema del procedimiento de conteo de la población microbiana de la rizósfera. Modificado de Acero, 1997

Una vez extraída la raíz de la planta en cuestión, se extrajo el suelo que se encontraba directamente adherido a la superficie de la raíz y se pesó un gramo de éste.

El suelo pesado se suspendió en 99 ml de solución salina estéril, se agitó en Vortex a fin de obtener una suspensión homogénea (Ver Figura 2.3).



*Figura 2.3.- Esquema de la preparación de la suspensión de la muestra de suelo rizosférico. Arriba: añadir 1 g de suelo a 99 ml de solución salina estéril; Arriba derecha: agitación en Vortex; Abajo: obtención de suspensiones homogéneas listas para realizar diluciones seriadas para el conteo de UFC.*

A continuación se tomó 1 ml de la suspensión y se trasladó a un tubo de ensayo con 9ml de solución salina estéril, esta dilución está representada por el factor  $10^{-1}$ , a partir de este punto, el proceso se repitió hasta llegar al factor de dilución de  $10^{-4}$ . La Figura 2.4 ilustra el proceso.

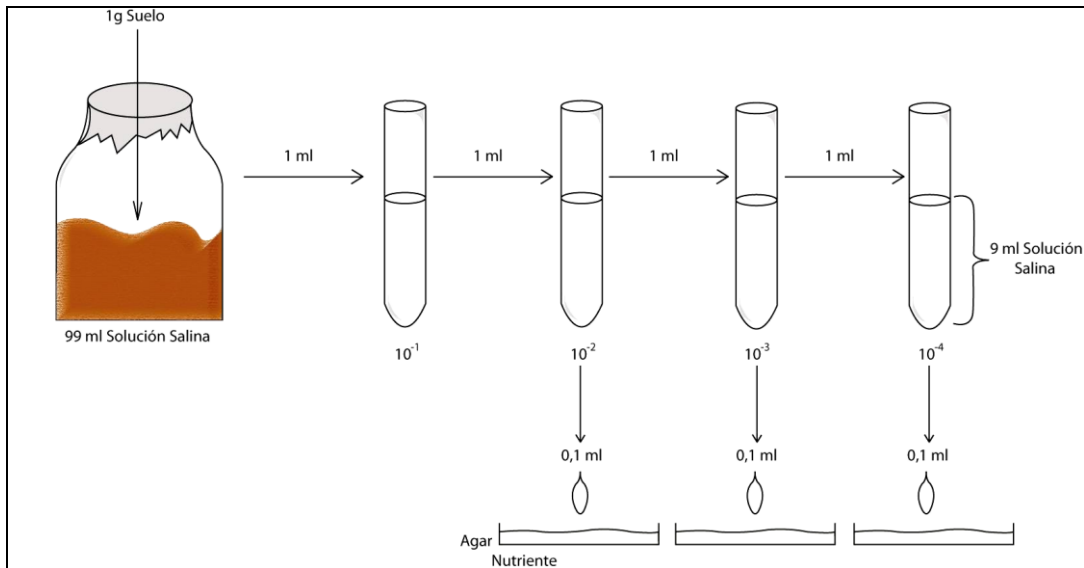


Figura 2.4.- Esquema de la preparación de la suspensión de la muestra de suelo rizosférico. Arriba: añadir 1 g de suelo a 99 ml de solución salina estéril; Arriba derecha: agitación en Vortex; Abajo: obtención de suspensiones homogéneas listas para realizar diluciones seriadas para el conteo de UFC.

Una vez realizadas las diluciones se tomaron 0.1ml de las diluciones  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$  y se colocaron en sendas cajas Petri estériles. Seguidamente se añadió agar nutriente fundido a una temperatura máxima de  $30^{\circ}\text{C}$ , se revuelve suavemente para esparcir la mezcla y se dejó solidificar.

Una vez solidificado el agar, se incubaron las cajas en posición invertida a  $28^{\circ}\text{C}$  por 24h. Cabe mencionar que todo el proceso se realizó bajo condiciones estériles en cabina de bioseguridad clase II y usando un mechero Bunsen.

Después del período de incubación se procedió al conteo de colonias que crecieron en cada caja, usando para esto un contador de campo oscuro LEICA-QUEBEC (Ver Figura 2.5).

Se calculó el número de UFC/g usando la expresión:

$$UFC/g = \frac{C \times FD}{V}$$

Donde:

- C: Número de colonias contadas en una caja
- FD: Factor de dilución
- V: Volumen (ml) de suspensión depositada en la caja.



Figura 2.5.- Conteo de UFC/g usando un contador de campo oscuro LEICA-Quebec.  
Foto: G. Arévalo, 2009.

#### 2.2.4 Aislamiento de colonias y establecimiento de cultivos puros

Se seleccionaron aquellas colonias que tuvieron mayor crecimiento durante la fase de conteo, usando criterios morfológicos de las colonias como tamaño, forma, elevación, margen, color, superficie, densidad y consistencia. Se tomaron muestras de cada colonia representativa y se hizo un análisis

microscópico a fin de confirmar la existencia de un solo tipo de bacteria en cada colonia, posteriormente se sembró una muestra en tubos de agar nutriente inclinado para su conservación y estudios de identificación y adaptación.

## **2.2.5 Identificación por pruebas bioquímicas**

### **2.2.5.1 Análisis microscópico**

Se tomaron muestras de cada género aislado y se esparcieron sobre un portaobjetos con una gota de agua, se empleó azul de metileno para teñir la capa y apreciar de mejor manera la morfología bacteriana en el microscopio a 1000 X.

### **2.2.5.2 Tinción Gram**

1. Se realizó un frotis sobre porta objetos con la muestra a analizar.
2. La muestra se deja secar al calor del mechero
3. Se añadió cristal violeta por 1 minuto
4. El exceso se retiró con agua
5. El procedimiento se repite usando esta vez lugol
6. Decolorar con alcohol cetona por 20 segundos
7. Lavar con agua y secar
8. Observar al microscopio

### **2.2.5.3 Prueba de Oxidasa**

La presencia de citocromo C oxidasa en la cadena de transporte de electrones puede detectarse utilizando un aceptor de electrones artificial p-fenilendiamina. Este test se usa para diferenciar *Pseudomonas* (positivo) de enterobacterias (negativo).

Se impregnan discos de papel con parafenilandiamina y se coloca en un cultivo creciendo en placas de agar nutritivo. Si las células producen la enzima citocromo C oxidasa, los discos de papel se tornan de color violeta o púrpura.

#### **2.2.5.4 Prueba de Catalasa**

La catalasa es una enzima que protege a las células frente al peróxido de hidrógeno producido en el metabolismo del oxígeno. Cataliza la formación de agua y oxígeno a partir del peróxido de hidrógeno. Es útil para distinguir *Streptococcus* (negativa) de *Staphylococcus* (positiva) y *Clostridium* (negativa) de *Bacillus* (positiva)

La actividad catalasa se detecta añadiendo unas gotas de peróxido de hidrógeno sobre las colonias en placa que no sea de agar sangre (daría falsos positivos). La producción de burbujas indica la presencia del enzima.

#### **2.2.5.5 Prueba de Ureasa**

Este enzima hidroliza la urea ( $\text{H}_2\text{N-CO-NH}_2$ ) y origina amonio lo que producirá un incremento del pH que puede detectarse con un indicador. Las bacterias se inoculan en un medio con glucosa-peptona y urea al 2%. Como indicador de pH se utiliza rojo fenol

#### **2.2.5.6 Prueba de Hidrólisis de Gelatina**

La mayoría de los polímeros son demasiado grandes para ser transportados dentro de las células. Las bacterias excretan enzimas extracelulares que hidrolizan esos polímeros transportando al interior de la célula en monómeros que les sirven para crecer.

La producción de proteasas es evaluada por incorporación de una proteína (gelatina o caseína) en un medio sólido en placa. Se evalúa la presencia de un halo claro alrededor de las estrías de sembrado.

### **2.2.5.7 Prueba de reducción de Nitratos**

Algunas bacterias pueden usar nitratos como aceptor final de e<sup>-</sup> en la respiración. El nitrato puede ser reducido a nitrito o en un paso más a gases (óxidos de nitrógeno). Las enterobacterias y *Pseudomonas* son usualmente positivos.

Las bacterias se inoculan en medios conteniendo nitrato potásico. El nitrito procedente de la reducción de células puede detectarse añadiendo alfanalfilamina y ácido sulfanílico produciéndose un color rojo. Se puede saber si el nitrato puede haberse reducido a más que a nitritos produciéndose gas. Si al añadir zinc en polvo no hay color rojo es que no hay nitrato porque se ha reducido a gas (desnitrificación).

### **2.2.5.8 Prueba de Oxidación-Fermentación de Glucosa**

En condiciones aerobias las bacterias pueden oxidar la glucosa hasta CO<sub>2</sub> gas. El oxígeno es el aceptor final de e<sup>-</sup> en el metabolismo respiratorio. En condiciones anaeróbicas en ausencia de un aceptor de e<sup>-</sup> como nitrato, las bacterias sólo pueden utilizar la glucosa por vía fermentativa. En este test se evalúa la capacidad de las bacterias para oxidar y/o fermentar produciendo ácido que se detecta gracias al azul de bromotinol (indicador de pH) Es útil en la distinción de *Pseudomonas* y enterobacterias.

Se inoculan tubos de medio con asas de punta recta. Uno de los tubos se recubre con aceite de parafina para aislarlo del oxígeno (tubo de fermentación) y otro no (tubo de oxidación).

### **2.2.5.9 Prueba de Sulfuro**

Muchas bacterias producen sulfuro de hidrógeno a partir de aminoácidos azufrados (cisteína o metionina) o tiosulfato.

La fermentación de sulfhídrico puede ser detectada incluyendo hierro reducido en el medio para formar un precipitado negro de FeS. Se inocula un medio de agar nutritivo conteniendo tiosulfato metionina y sulfato ferroso.



#### **2.2.5.10 Prueba de Indol**

Uno de los test utilizado para diferenciar enterobacterias.

Existen bacterias que producen triptofanasa que convierte el triptófano en indol. La bacteria se crece en medios que contienen triptófano (caldo de triptona). La presencia de indol se ensaya añadiendo dimetilaminobenzaldehído

#### **2.2.5.11 Prueba de Movilidad**

La movilidad de las bacterias es consecuencia de la presencia de flagelos. El movimiento puede observarse en preparación en fresco con el microscopio de contraste de fase. Para ver la movilidad se realiza una preparación en fresco que se observa en contraste de fases. La movilidad debe distinguirse del movimiento Browniano debido a las corrientes en la preparación.

#### **2.2.5.12 Prueba de Voges Proskauer**

Uno de los test del IMVIC para enterobacterias es el Voges Proskauer. Las especies que llevan a cabo fermentación a butanodiol de la glucosa acumulan acetoína en el medio. Las bacterias se inoculan en caldo glucosa-peptona. Las especies que llevan a cabo la fermentación butanodiólica de la glucosa aumentan acetoína en el medio. Se añade alfa-naftol en medio alcalino (KOH). La acetoína se convierte en diacetilo que reacciona formándose un color rojo.

#### **2.2.5.13 Prueba de Rojo de Metilo**

Es uno de los test del IMVIC para bacterias entéricas. Algunas vías fermentativas originan ácidos orgánicos mientras otras originan productos que son neutros. Las bacterias se crecen en caldo de glucosa-peptona. Si se fermenta el azúcar el pH baja por debajo de 4.3. Se añade rojo de metilo e indicar que es rojo a pH <4.3 y amarillo a pH >4.3.

#### **2.2.5.14 Prueba de Citrato**

Es uno de los test usado para diferenciar enterobacterias. El crecimiento consume el ácido y como consecuencia se produce un incremento de pH en el medio y el indicador tira de verde a azul. El citrato es la única fuente de carbono y se realiza sembrando la bacteria en la superficie de un agar de Simmon's inclinando el tubo

#### **2.2.5.15 Prueba de Producción de Pigmento**

Se registra la coloración que presenta la colonia en función del pigmento que produce la especie.

#### **2.2.5.16 Prueba de degradación de Almidón**

Los polisacáridos, como el almidón son demasiados largos para ser transportados al interior de la célula. Los microorganismos excretan amilasas que hidrolizan esos polímeros hasta oligo o monosacáridos que pueden usarse como sustratos para crecer. La hidrólisis de almidón es analizada en medios conteniendo almidón en placa. Después de incubar se inundan las placas con lugol que al unirse con el almidón intacto forma un complejo púrpura.

#### **2.2.5.17 Prueba Mac Conkey**

Es un medio diferencial que permite distinguir entre enterobacterias que hidrolizan lactosa y las que no lo hacen. La hidrólisis de la lactosa produce ácidos orgánicos y las colonias que la hidrolizan adquieren un color rojo. Las colonias lactosas negativas permanecen incoloras aunque el medio tira a amarillo por la subida de pH que origina la utilización de las proteínas (peptona) del medio. Se inoculan placas del medio y se incuban a 37 °C

### **2.2.6 Selección de microorganismos para Bioadición**

Esta fase permitió seleccionar aquellos microorganismos aislados a partir de la rizósfera de las plantas alternativas que mejor se adapten a las condiciones de los lechos filtrantes; para esto, se sembró una muestra de cada

colonia en agar extracto de tierra (Ver Figura 2.6) preparado con la siguiente formulación:

1. Tomar muestras de tierra en distintos puntos de los lechos filtrantes
2. Suspender en agua destilada estéril en proporción 1:1 (p/v)
3. Esterilizar la solución resultante
4. Dejar reposar y tomar con cuidado el sobrenadante
5. Añadir 15g de agar por cada litro de extracto
6. Esterilizar
7. Las cajas inoculadas se incubaron a 28°C por 24-48 horas

Se seleccionaron las colonias que mostraron un crecimiento significativo en el medio, para posteriormente, someterlos a una proliferación masiva.



*Figura 2.6.- Preparación del medio Extracto de Tierra: Izquierda: Tierra tomada de los lechos filtrantes suspendida en agua del influente; Derecha: a la suspensión filtrada se adiciona agar como agente solidificante. Foto: G. Arévalo, 2009.*

### **2.2.7 Proliferación masiva**

Se prepararon frascos de vidrio conteniendo 100ml de medio mineral modificado de Jaanis (2007) con la siguiente formulación:



Los frascos se inocularon con las bacterias seleccionadas y se incubaron a 28°C, iniciando un volumen de 100ml para posteriormente hacer transferencia hacia volúmenes crecientes hasta alcanzar 1L de suspensión bacteriana de cada colonia seleccionada. Para obtener el volumen deseado, se empleó una incubadora con agitador orbital.

### **2.2.8 Inoculación**

La suspensión bacteriana se inyectó directamente en la rizósfera de las plantas a usarse como alternativa en el tratamiento, cada una de estas especies vegetales está sembrada en contenedores de prueba de 1 m<sup>2</sup> con una densidad de 20 plantas repartidas en toda la superficie del contenedor.

## 2.2.9 Análisis de agua al final del tratamiento

Se determinó la eficiencia del sistema mediante un análisis de agua después de una semana de la inoculación bacteriana; para esto se tomaron muestras del influente así como también de la salida de los contenedores de prueba y se determinaron los mismos parámetros mostrados en el Cuadro 2.1.

## 2.3 Análisis Estadístico

### 2.3.1 Cálculo del tamaño de la muestra

Previo al cálculo del tamaño de la muestra, se recolectaron medidas de altura y diámetro de 30 plantas de Vetiver al azar dentro de los lechos filtrantes; esta información permitió calcular el Coeficiente de Variación (CV) mediante el siguiente proceso:

Parámetro	S	$\bar{X}$	$CV = \frac{S}{\bar{X}} * 100$
Altura (cm)	7.94	77.87	10.19
Diámetro (cm)	2.39	7.50	31.86

Se tomó el menor valor de  $CV = 10.19$  y se empleó la siguiente expresión:

$$n = \frac{\left(t \frac{\alpha}{2} * gl\right)^2 (CV)^2}{(E\%)^2 + \frac{\left(t \frac{\alpha}{2} * gl\right)^2 (CV)^2}{2368}}$$

Donde:

- $t \frac{\alpha}{2} * gl = 2.045$
- $CV = 10.19$

- E%= 10
- Población total= 2368

El valor obtenido de n es de 4.33, es decir, que cada muestra se conformó con 4 raíces de cada planta a estudiar.

### 2.3.2 Análisis de la población microbiológica de la rizósfera

De acuerdo al procedimiento establecido, se realizó un análisis cuantitativo de la población microbiana expresada como Unidades Formadoras de Colonias (UFC/g) contenida en la rizósfera de Vetiver *Chrysopogon zizanioides* (S1) y de las especies nativas *Eleocharis elegans* (S2), *Carex lemanianna* (S3) y *Cypera bipartitus* (S4) generando de esta manera 4 tratamientos (Ver cuadro 2.2).

Cuadro 2.2.- Parámetros determinados en el análisis de agua a la entrada del sistema de lechos filtrantes.

Tratamientos	Especie	Variable
S1	<i>Chrysopogon zizanioides</i>	UFC/g
S2	<i>Eleocharis elegans</i>	UFC/g
S3	<i>Carex lemanianna</i>	UFC/g
S4	<i>Cypera bipartitus</i>	UFC/g

El ensayo se dispuso en un diseño de bloques completos al azar con tres repeticiones en donde se realizó un análisis de varianza para comparar el número de unidades formadoras de colinas UFC en cada especie ( $S_j$ ) mediante el siguiente modelo matemático:

$$Y_{ij} = \mu + B_i + S_j + e_{ij}$$

Donde:

$Y_{ij}$ : variable aleatoria

$B_i$ : efecto del  $i$  ésimo bloque

$S_j$ : efecto del  $j$  ésima especie

$e_{ij}$ : error experimental

El análisis de varianza permitió determinar la aceptación o rechazo de la Hipótesis Nula: El número de Unidades formadoras de colonias UFC en las especies vegetales no tendrá diferencias estadísticas significativas.

También se efectuaron pruebas de comparación de medias de Duncan al 5%.

### 3. CAPÍTULO III. RESULTADOS

#### 3.1 Análisis inicial de agua

Los informes de los análisis de agua realizados por los laboratorios ANNCY en Quito, presentaron los resultados mostrados en el Cuadro 3.1.

*Cuadro 3.1.- Resultados correspondientes al análisis de agua del influente y de 6 lechos de prueba en la estación Páramo PS4, OCP. Los ensayos marcados con (\*) no están incluidos en el alcance de acreditación del OAE.*

<b>Influente</b>			
<b>Ensayo</b>	<b>Unidades</b>	<b>Valor Límite Permisible</b>	<b>Resultado</b>
pH	Unid. pH	5<pH<9	6,87
Demanda Química de Oxígeno	mg/l	<80	316
Coliformes Fecales*	NMP/100ml	<1000	2420
Cloro Libre Residual	mg/l	<2.0	0,05
Conductividad	µs/cm		358
Nitratos*	mg/l NO3		20,2
Nitrógeno Total*	mg/l NTK		24,6
Sólidos Totales	mg/l		282
Coliformes Totales*	NMP/100ml		2420
<b>Lecho 1</b>			
<b>Ensayo</b>	<b>Unidades</b>	<b>Valor Límite Permisible</b>	<b>Resultado</b>
pH	Unid. pH	5<pH<9	7,42
Demanda Química de Oxígeno	mg/l	<80	89
Coliformes Fecales*	NMP/100ml	<1000	2420
Cloro Libre Residual	mg/l	<2.0	0,05
Conductividad	µs/cm		507
Nitratos*	mg/l NO3		5,7
Nitrógeno Total*	mg/l NTK		2,4
Sólidos Totales	mg/l		358
Coliformes Totales*	NMP/100ml		2420



Cuadro 3.1.- Continuación.

<b>Lecho 2</b>			
<b>Ensayo</b>	<b>Unidades</b>	<b>Valor Límite Permisible</b>	<b>Resultado</b>
pH	Unid. pH	5<pH<9	8,27
Demanda Química de Oxígeno	mg/l	<80	36
Coliformes Fecales*	NMP/100ml	<1000	2420
Cloro Libre Residual	mg/l	<2.0	0,05
Conductividad	µs/cm		517
Nitratos*	mg/l NO3		4,4
Nitrógeno Total*	mg/l NTK		3,9
Sólidos Totales	mg/l		334
Coliformes Totales*	NMP/100ml		2420
<b>Lecho 3</b>			
<b>Ensayo</b>	<b>Unidades</b>	<b>Valor Límite Permisible</b>	<b>Resultado</b>
pH	Unid. pH	5<pH<9	8,23
Demanda Química de Oxígeno	mg/l	<80	45
Coliformes Fecales*	NMP/100ml	<1000	2420
Cloro Libre Residual	mg/l	<2.0	0,05
Conductividad	µs/cm		517
Nitratos*	mg/l NO3		8,4
Nitrógeno Total*	mg/l NTK		3,9
Sólidos Totales	mg/l		348
Coliformes Totales*	NMP/100ml		2420
<b>Lecho 4</b>			
<b>Ensayo</b>	<b>Unidades</b>	<b>Valor Límite Permisible</b>	<b>Resultado</b>
pH	Unid. pH	5<pH<9	7,33
Demanda Química de Oxígeno	mg/l	<80	66
Coliformes Fecales*	NMP/100ml	<1000	2420
Cloro Libre Residual	mg/l	<2.0	0,05
Conductividad	µs/cm		519
Nitratos*	mg/l NO3		4,8
Nitrógeno Total*	mg/l NTK		3,3
Sólidos Totales	mg/l		362
Coliformes Totales*	NMP/100ml		2420

Cuadro 3.1.- Continuación.

Lecho 5			
Ensayo	Unidades	Valor Límite Permisible	Resultado
pH	Unid. pH	5<pH<9	7,23
Demanda Química de Oxígeno	mg/l	<80	33
Coliformes Fecales*	NMP/100ml	<1000	2420
Cloro Libre Residual	mg/l	<2.0	0,05
Conductividad	µs/cm		553
Nitratos*	mg/l NO3		16,3
Nitrógeno Total*	mg/l NTK		4,2
Sólidos Totales	mg/l		418
Coliformes Totales*	NMP/100ml		2420
Lecho 6			
Ensayo	Unidades	Valor Límite Permisible	Resultado
pH	Unid. pH	5<pH<9	7,28
Demanda Química de Oxígeno	mg/l	<80	52
Coliformes Fecales*	NMP/100ml	<1000	2420
Cloro Libre Residual	mg/l	<2.0	0,05
Conductividad	µs/cm		532
Nitratos*	mg/l NO3		5,7
Nitrógeno Total*	mg/l NTK		2,1
Sólidos Totales	mg/l		392
Coliformes Totales*	NMP/100ml		2420

### 3.2 Análisis de población microbiológica de la rizósfera

De acuerdo al procedimiento aplicado, la población microbiológica correspondiente a Vetiver (*Chrysopogon zizanioides*) contiene un promedio de  $1.944 \times 10^5$  UFC por cada gramo de suelo rizosférico; la especie vegetal *Eleocharys elegans* un promedio de  $8.969 \times 10^5$  UFC/g; *Carex lemanianna* con un promedio de  $3.305 \times 10^6$  UFC/g y *Cypera bipartitus* un promedio de  $1.718 \times 10^6$  UFC/g.

Se aislaron en total 11 géneros bacterianos (de Vetiver: 4 géneros; *Eleocharys*: 2 géneros; *Carex*: 3 géneros y *Cypera*: 2 géneros) que fueron sometidos a identificación por pruebas bioquímicas.

Los resultados del análisis de conteo de población microbiónica se resumen en el Cuadro 3.2.

*Cuadro 3.2.- Resumen de los resultados del análisis de población microbiónica.*

<b>Especie Vegetal</b>	<b>UFC/g Promedio</b>	<b>Nº de colonias aisladas de la rizósfera</b>
Vetiver ( <i>Chrysopogon zizanioides</i> )	$1.944 \times 10^5$	4
<i>Eleocharys elegans</i>	$8.969 \times 10^5$	2
<i>Carex lemanianna</i>	$3.305 \times 10^6$	3
<i>Cypera bipartitus</i>	$1.718 \times 10^6$	2

### 3.3 Identificación por pruebas bioquímicas

#### 3.3.1 Géneros aislados de la rizósfera de Vetiver (*Chrysopogon zizanioides*)

Cuadro 3.3.- Pruebas bioquímicas de identificación para el primer género bacteriano aislado a partir del suelo rizosférico de Vetiver (*Chrysopogon zizanioides*)

OBSERVACIÓN MACROSCÓPICA DE LA COLONIA	RESULTADO
Tamaño de la colonia	1-3 mm
Forma	Circular
Elevación	Cóncava
Margen	Regular
Color	Translúcida
Superficie	Brillante
Densidad	Abundante
Consistencia	Butirosa
OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA	
Coloración Gram	Negativa
Esporas	-
Morfología celular	Bacilos
PRUEBAS BIOQUÍMICAS	
Oxidasa	+
Catalasa	+
Urea	-
Gelatina	-
NO <sub>3</sub>	-
Glucosa O-F	Inerte (No Glucolítico)
Sulfuro	-
Indol	-
Movilidad	+
VP	-
RM	-
Citrato	+
Manitol	-
Producción de pigmento	-
Degradación de almidón	+
Degradación de glucosa	-
Crecimiento en MacConkey	Colonias translúcidas
<b>BACTERIA</b>	<b>Pseudomonas spp (1)</b>

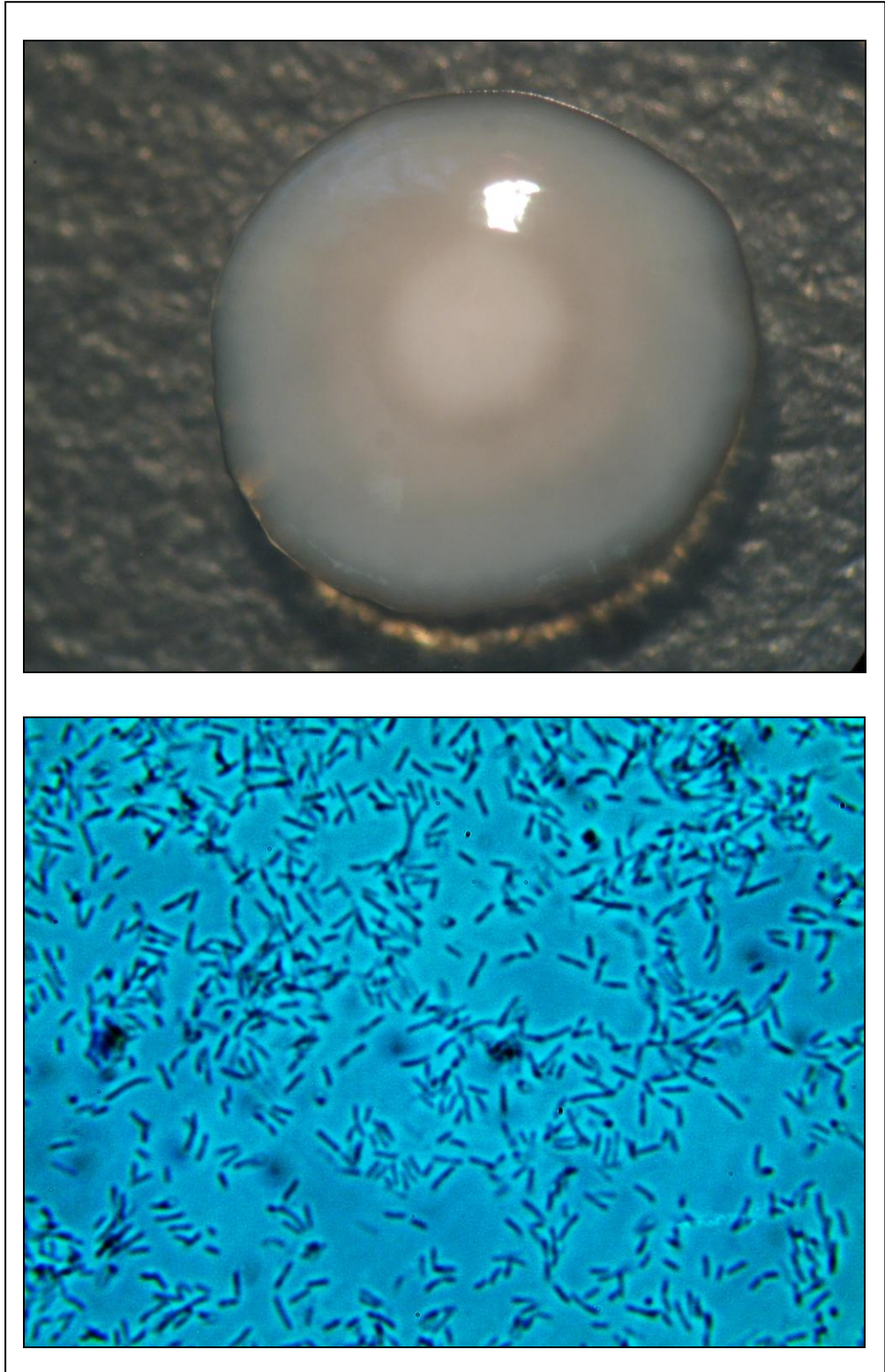
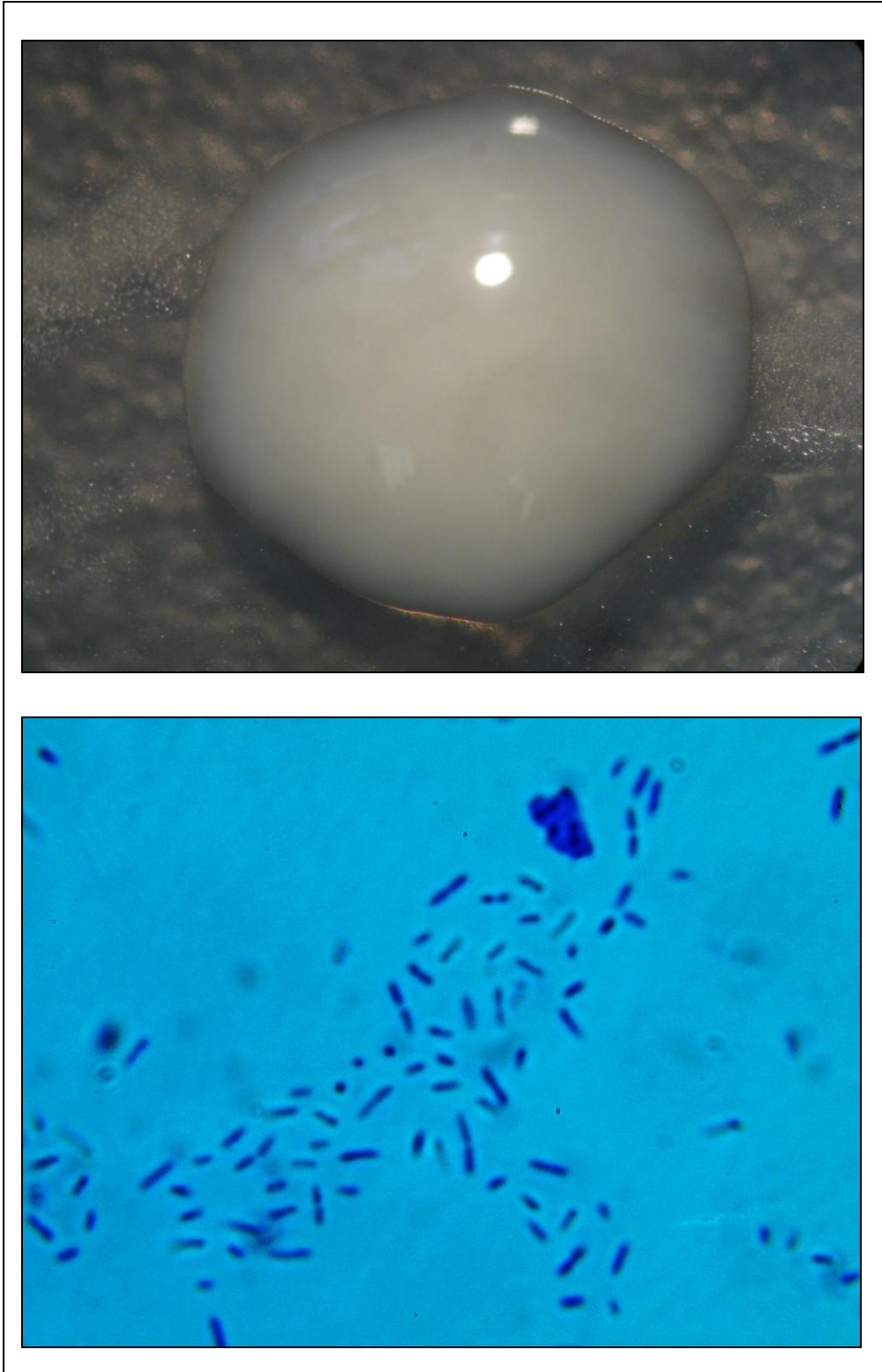


Figura 3.1.- Arriba: detalle de la colonia de *Pseudomonas* spp. (1). Abajo: fotografía microscópica 1000X de la misma colonia, se usó azul de metileno para lograr un mejor contraste. Foto: G. Arévalo, 2009.

Cuadro 3.4.- Pruebas bioquímicas de identificación para el segundo género bacteriano aislado a partir del suelo rizosférico de Vetiver (*Chrysopogon zizanioides*)

OBSERVACIÓN MACROSCÓPICA DE LA COLONIA	RESULTADO
Tamaño de la colonia	1-3 mm
Forma	Circular
Elevación	Cóncava
Margen	Regular
Color	Blanquesino
Superficie	Brillante
Densidad	Abundante
Consistencia	Butirosa
OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA	
Coloración Gram	Negativa
Esporas	-
Morfología celular	Bacilos
PRUEBAS BIOQUÍMICAS	
Oxidasa	+
Catalasa	+
Urea	+
Gelatina	-
NO <sub>3</sub>	+
Glucosa O-F	Inerte (No Glucolítico)
Sulfuro	-
Indol	-
Movilidad	-
VP	-
RM	-
Citrato	-
Manitol	-
Producción de pigmento	-
Degradación de almidón	-
Degradación de glucosa	-
Crecimiento en MacConkey	-
<b>BACTERIA</b>	<b>Acinetobacter spp.</b>



*Figura 3.2.- Arriba: detalle de la colonia de Acinetobacter spp.. Abajo: fotografía microscópica 1000X de la misma colonia, se usó azul de metileno para lograr un mejor contraste. Foto: G. Arévalo, 2009.*

Cuadro 3.5.- Pruebas bioquímicas de identificación para el tercer género bacteriano aislado a partir del suelo rizosférico de Vetiver (*Chrysopogon zizanioides*)

OBSERVACIÓN MACROSCÓPICA DE LA COLONIA	RESULTADO
Tamaño de la colonia	1-3 mm
Forma	Circular
Elevación	Cóncava
Margen	Regular
Color	Translúcida
Superficie	Brillante
Densidad	Abundante
Consistencia	Butirosa
OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA	
Coloración Gram	Negativa
Esporas	-
Morfología celular	Bacilos
PRUEBAS BIOQUÍMICAS	
Oxidasa	+
Catalasa	+
Urea	+
Gelatina	-
NO <sub>3</sub>	-
Glucosa O-F	Inerte (No Glucolítico)
Sulfuro	-
Indol	-
Movilidad	+
VP	-
RM	-
Citrato	-
Manitol	-
Producción de pigmento	amarillo-naranja
Degradación de almidón	-
Degradación de glucosa	-
Crecimiento en MacConkey	rosa
<b>BACTERIA</b>	<b>Pseudomonas spp (2)</b>



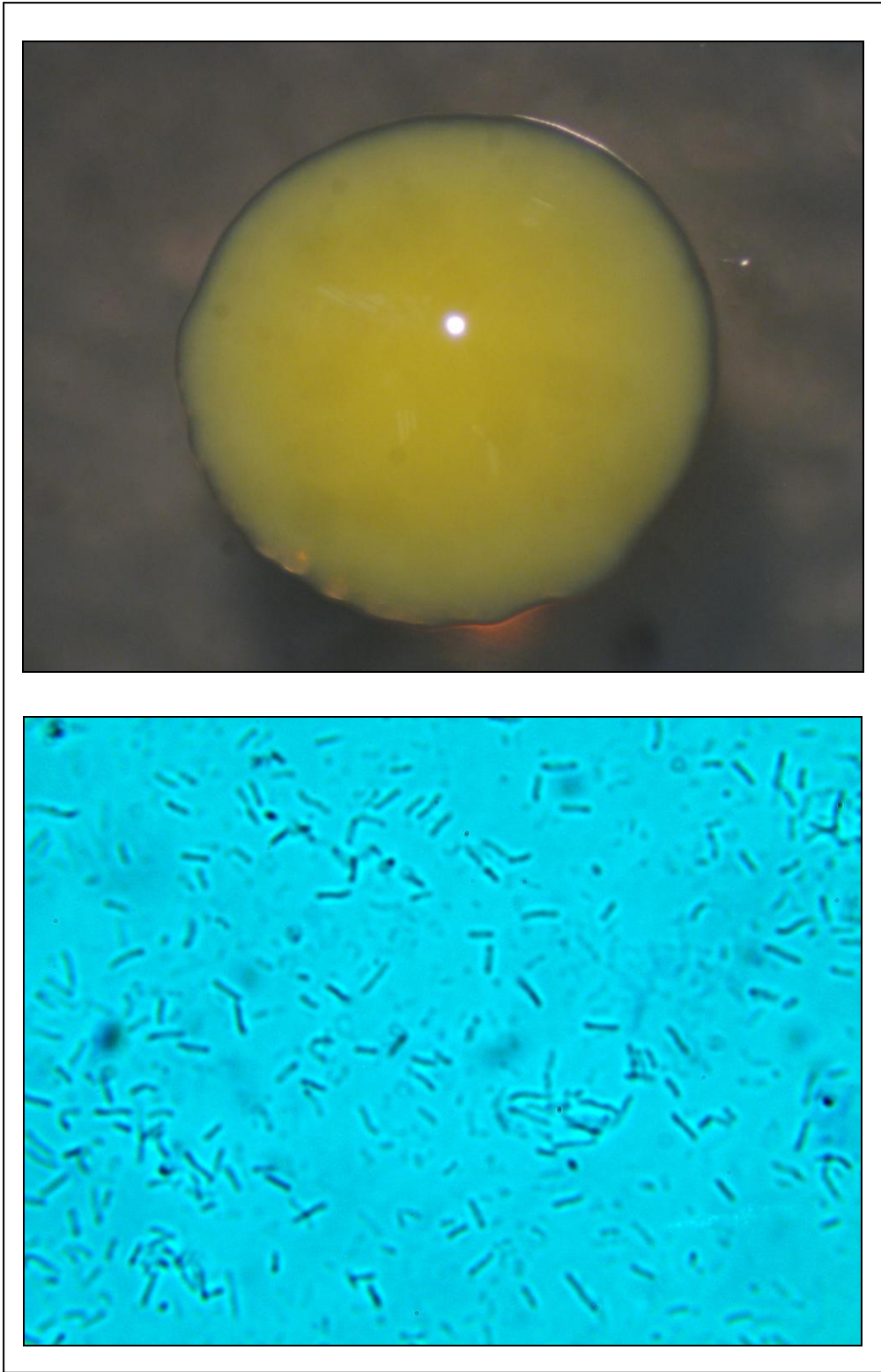
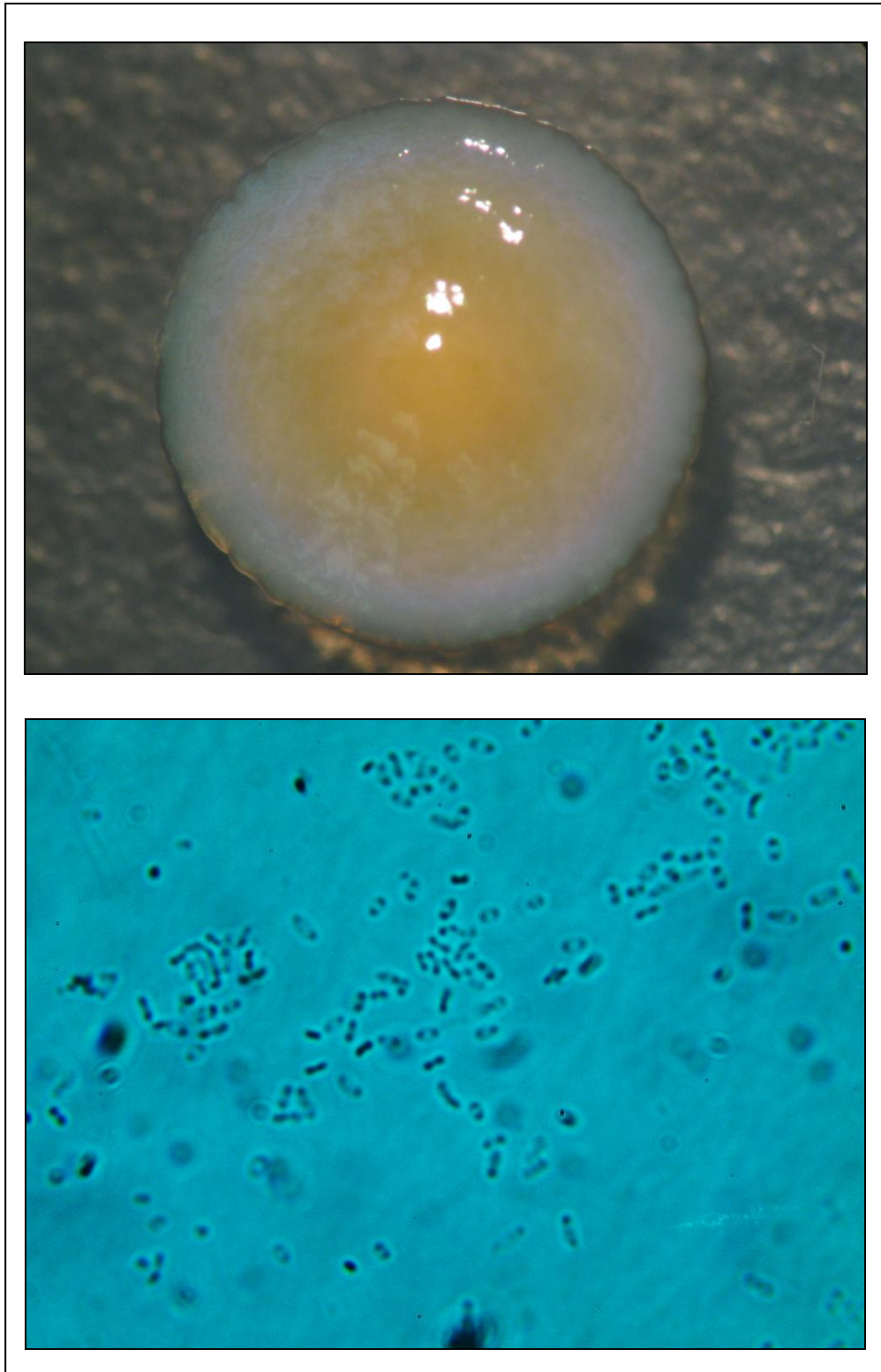


Figura 3.3.- Arriba: detalle de la colonia de *Pseudomonas spp* (2). Abajo: fotografía microscópica 1000X de la misma colonia, se usó azul de metileno para lograr un mejor contraste. Foto: G. Arévalo, 2009.

Cuadro 3.6.- Pruebas bioquímicas de identificación para el cuarto género bacteriano aislado a partir del suelo rizosférico de Vetiver (*Chrysopogon zizanioides*).

OBSERVACIÓN MACROSCÓPICA DE LA COLONIA	RESULTADO
Tamaño de la colonia	3 mm
Forma	Circular
Elevación	Cóncava
Margen	Regular
Color	Translúcida
Superficie	Brillante
Densidad	Abundante
Consistencia	Butirosa
OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA	
Coloración Gram	Negativa
Esporas	-
Morfología celular	Bacilos
PRUEBAS BIOQUÍMICAS	
Oxidasa	-
Catalasa	+
Urea	-
Gelatina	-
NO <sub>3</sub>	+
Glucosa O-F	Fermentativo
Sulfuro	-
Indol	-
Movilidad	-
VP	-
RM	+
Citrato	-
Manitol	+
Producción de pigmento	amarillo
Degradación de almidón	-
Degradación de glucosa	+
Crecimiento en MacConkey	+
<b>BACTERIA</b>	<b>Flavobacterium spp.</b>

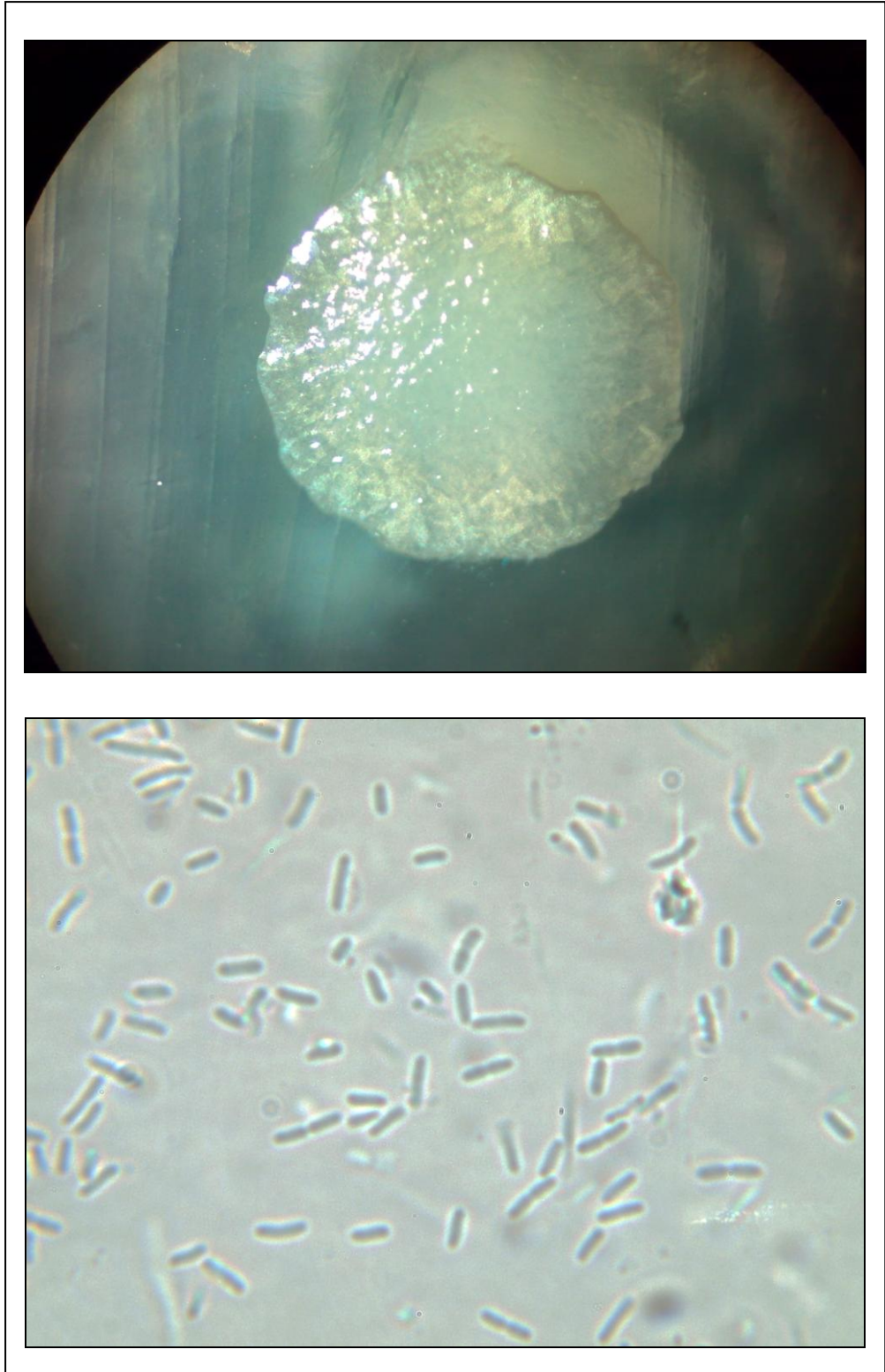


*Figura 3.4.- Arriba: detalle de la colonia de Flavobacterium spp.. Abajo: fotografía microscópica 1000X de la misma colonia, se usó azul de metileno para lograr un mejor contraste. Foto: G. Arévalo, 2009.*

### 3.3.2 Géneros aislados de la rizósfera de *Eleocharis elegans*

Cuadro 3.7.- Pruebas bioquímicas de identificación para el primer género bacteriano aislado a partir del suelo rizosférico de *Eleocharis elegans*.

OBSERVACIÓN MACROSCÓPICA DE LA COLONIA	RESULTADO
Tamaño de la colonia	1 mm
Forma	Circular
Elevación	Convexa
Margen	Entera
Color	Crema
Superficie	Brillante
Densidad	Escasa
Consistencia	Butirosa
OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA	
Coloración Gram	Negativa
Esporas	-
Morfología celular	Bacilos
PRUEBAS BIOQUÍMICAS	
Oxidasa	+
Catalasa	+
OF Anaerobiosis	-
OF Aerobiosis	-
Pigmento amarillo	+
Rojo de metilo	-
VP	-
Sulfuro	-
Indol	-
Movilidad	-
Nitratos	-
Urea	+
TSI	K/K
Citrato	+
Gelatina	-
Almidón	-
Esculina	-
<b>BACTERIA</b>	<b>Flavobacterium spp (3)</b>



*Figura 3.5.- Arriba: detalle de la colonia de Flavobacterium spp.. Abajo: fotografía microscópica 1000X de la misma colonia. Foto: G. Arévalo, 2009.*

Cuadro 3.8.- Pruebas bioquímicas de identificación para el segundo género bacteriano aislado a partir del suelo rizosférico de *Eleocharis elegans*.

OBSERVACIÓN MACROSCÓPICA DE LA COLONIA	RESULTADO
Tamaño de la colonia	3 mm
Forma	Amiboide
Elevación	Plana
Margen	Rizoide
Color	Blanca
Superficie	Opaca
Densidad	Abundante
Consistencia	Filamentosa
OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA	
Coloración Gram	Positiva
Esporas	+
Morfología celular	Bacilos
PRUEBAS BIOQUÍMICAS	
Oxidasa	-
Catalasa	+
OF Anaerobiosis	-
OF Aerobiosis	+
Pigmento amarillo	+
Manitol	+
Lecitinasa	-
Rojo de metilo	-
VP	+
Sulfuro	-
Indol	-
Movilidad	-
Nitratos	+
Urea	+
TSI	K/A
Citrato	+
Gelatina	+
Esculina	-
Almidón	+
<b>BACTERIA</b>	<b>Bacillus subtilis</b>



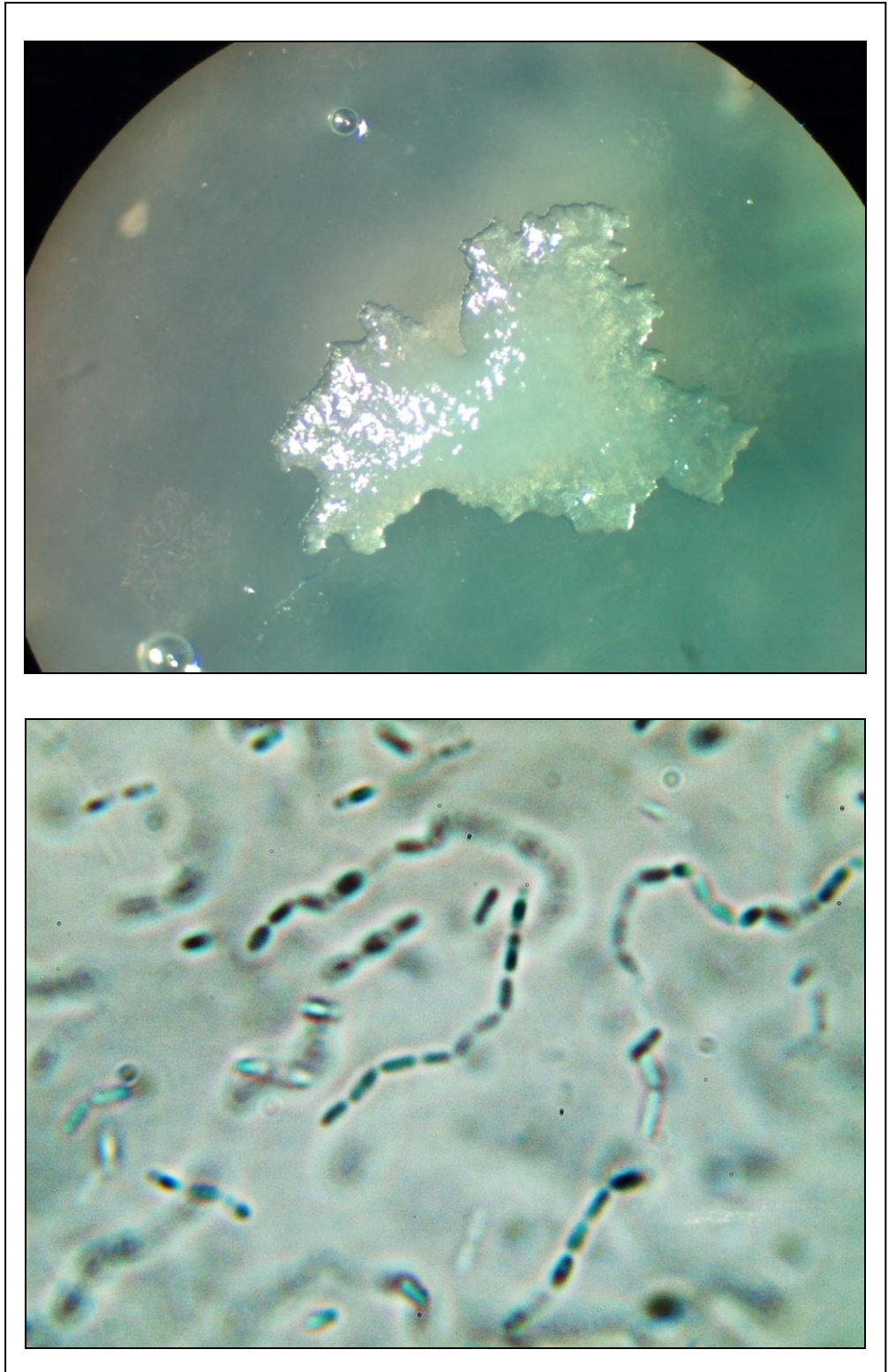


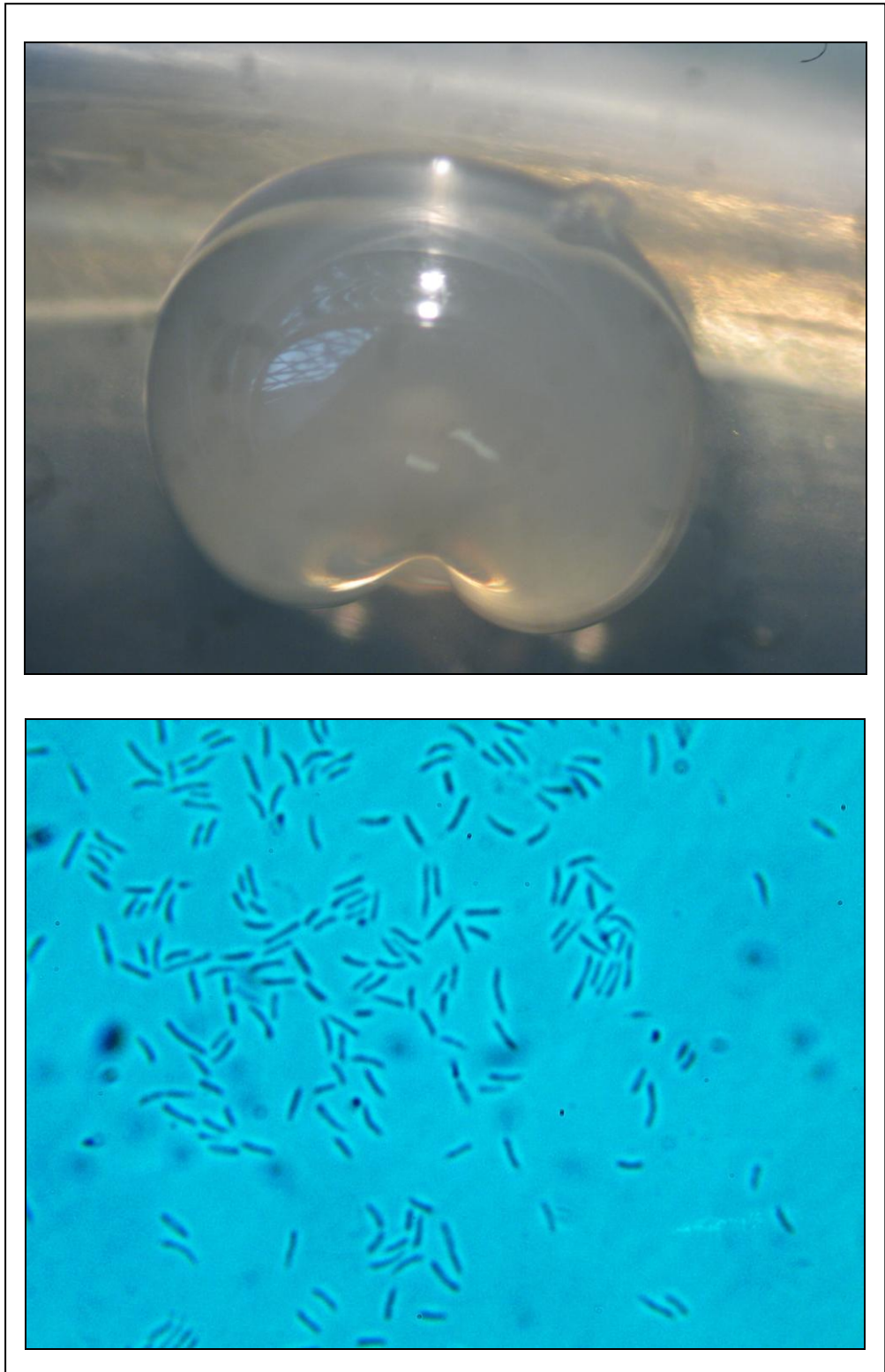
Figura 3.6.- Arriba: detalle de la colonia de *Bacillus subtilis*. Abajo: fotografía microscópica 1000X de la misma colonia. Foto: G. Arévalo, 2009.

### 3.3.3 Géneros aislados de la rizósfera de *Carex lemanianna*

Cuadro 3.9.- Pruebas bioquímicas de identificación para el primer género bacteriano aislado a partir del suelo rizosférico de *Carex lemanianna*.

OBSERVACIÓN MACROSCÓPICA DE LA COLONIA	RESULTADO
Tamaño de la colonia	1-3 mm
Forma	Circular
Elevación	Plana
Margen	Uniforme
Color	Translúcida
Superficie	Brillante
Densidad	Abundante
Consistencia	Butirosa
OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA	
Coloración Gram	Negativa
Esporas	-
Morfología celular	Bacilos
PRUEBAS BIOQUÍMICAS	
Oxidasa	+
Catalasa	+
Urea	+
Gelatina	-
NO <sub>3</sub>	+
Glucosa O-F	Sacarolítico
Sulfuro	-
Indol	-
Movilidad	+
VP	-/+
RM	-
Citrato	+
Producción de pigmento (Cetrimida)	+ (verde)
Degradación de almidón	+
Degradación de glucosa	+
Crecimiento en MacConkey	+ Colonias translúcidas
<b>BACTERIA</b>	<b>Pseudomonas spp (3)</b>

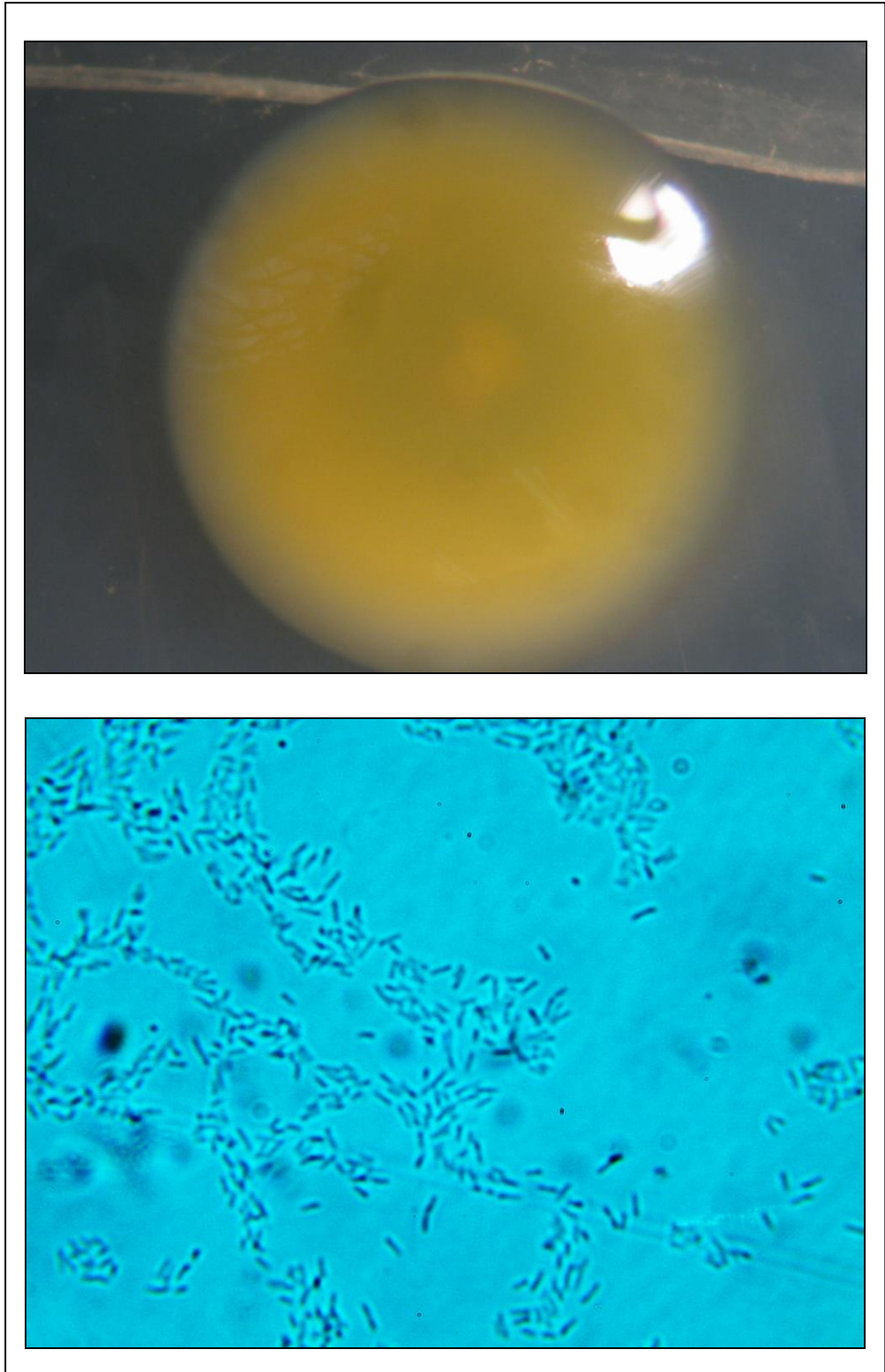




*Figura 3.7.- Arriba: detalle de la colonia de Flavobacterium spp.. Abajo: fotografía microscópica 1000X de la misma colonia, se usó azul de metileno para lograr un mejor contraste. Foto: G. Arévalo, 2009.*

Cuadro 3.10.- Pruebas bioquímicas de identificación para el segundo género bacteriano aislado a partir del suelo rizosférico de *Carex lemanianna*.

OBSERVACIÓN MACROSCÓPICA DE LA COLONIA	RESULTADO
Tamaño de la colonia	2 mm
Forma	Circular
Elevación	Plana
Margen	Uniforme
Color	Amarilla
Superficie	Brillante
Densidad	Abundante
Consistencia	Butirosa
OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA	
Coloración Gram	Negativa
Esporas	-
Morfología celular	Bacilos
PRUEBAS BIOQUÍMICAS	
Oxidasa	-
Catalasa	+
Urea	-
Gelatina	-
NO <sub>3</sub>	-
Glucosa O-F	No sacarolítico
Sulfuro	-
Indol	-
Movilidad	-
VP	-/+
RM	-
Citrato	-
Producción de pigmento	amarillo
Degradación de almidón	-
Degradación de glucosa	-
Crecimiento en MacConkey	-
<b>BACTERIA</b>	<b>Flavobacterium spp. 2</b>



*Figura 3.8.- Arriba: detalle de la colonia de Flavobacterium spp. (2). Abajo: fotografía microscópica 1000X de la misma colonia, se usó azul de metileno para lograr un mejor contraste. Foto: G. Arévalo, 2009.*

Cuadro 3.11.- Pruebas bioquímicas de identificación para el tercer género bacteriano aislado a partir del suelo rizosférico de *Carex lemanianna*.

OBSERVACIÓN MACROSCÓPICA DE LA COLONIA	RESULTADO
Tamaño de la colonia	5 mm
Forma	Rizoide
Elevación	Plana
Margen	Ondulado
Color	Blanca
Superficie	Opaca
Densidad	Abundante
Consistencia	Seca
OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA	
Coloración Gram	Positiva
Esporas	+
Morfología celular	Bacilos
PRUEBAS BIOQUÍMICAS	
Oxidasa	-
Catalasa	+
Urea	+
Gelatina	-
NO <sub>3</sub>	-
Glucosa O-F	Inerte (No Glucolítico)
Sulfuro	-
Indol	-
Movilidad	-
VP	+
RM	-
Citrato	+
Producción de pigmento	-
Degradación de almidón	-
Degradación de glucosa	-
Lipasa	+
<b>BACTERIA</b>	<b>Bacillus spp. (1)</b>



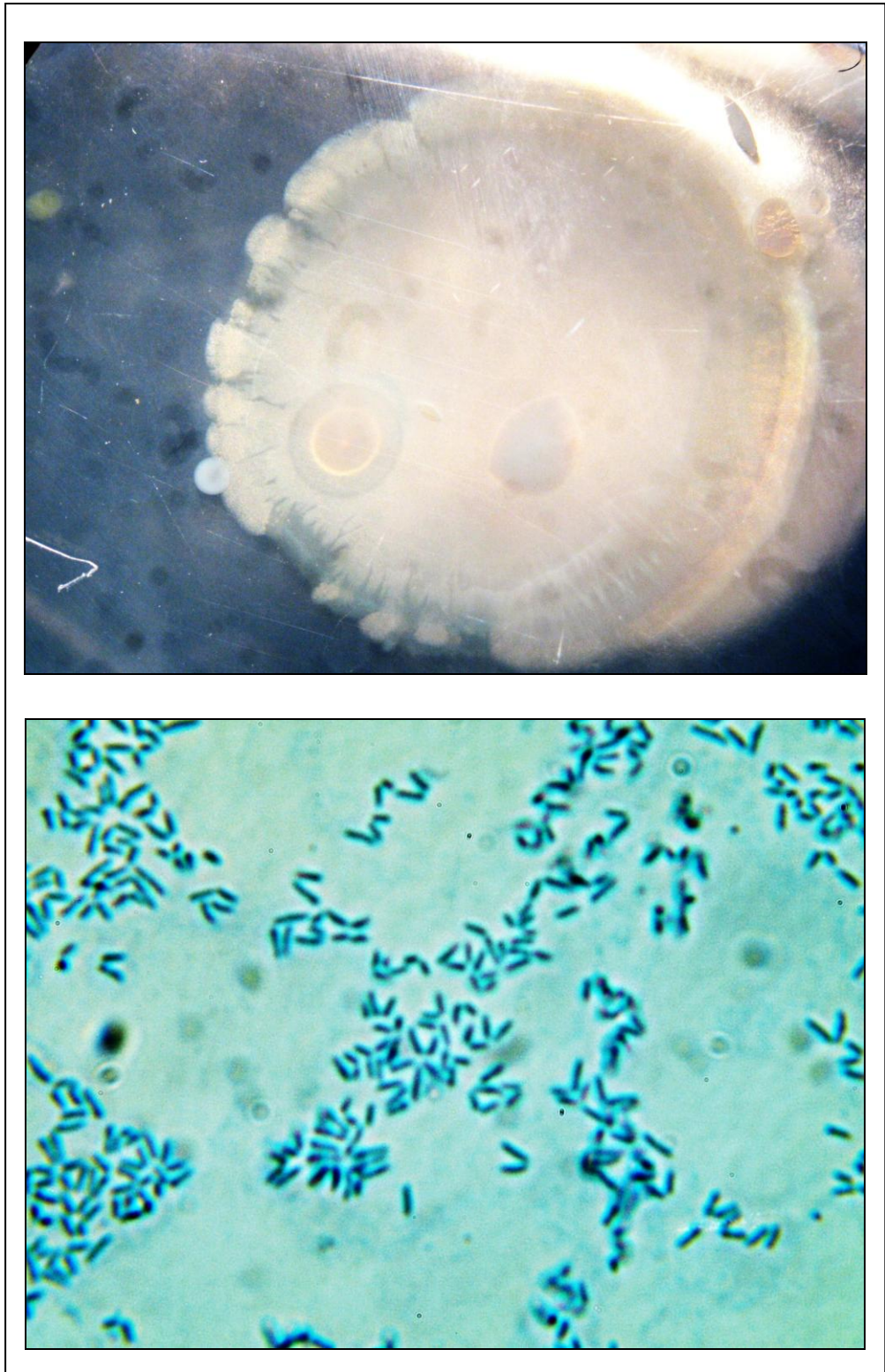
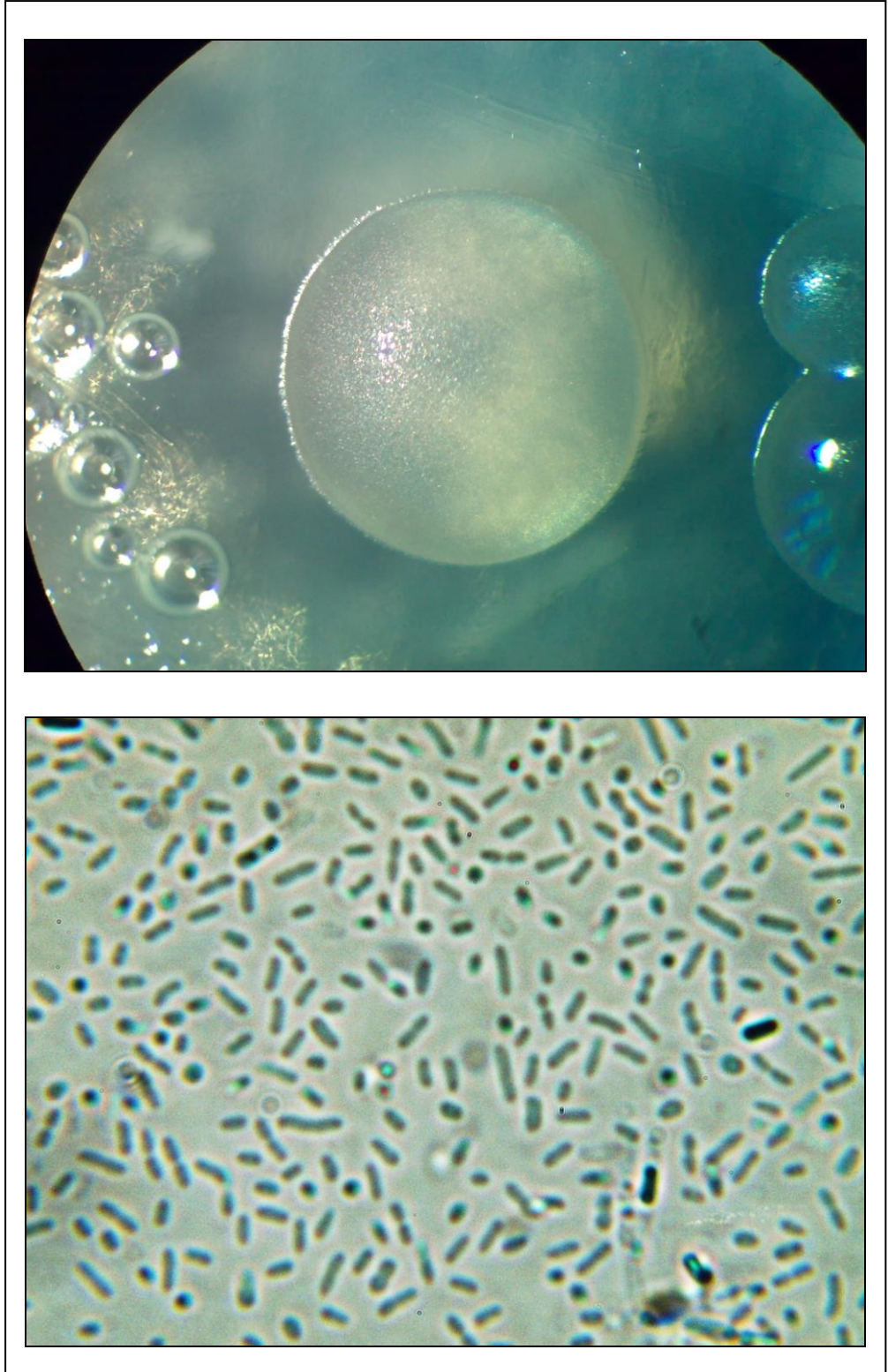


Figura 3.9.- Arriba: detalle de la colonia de *Bacillus* spp. (1). Abajo: fotografía microscópica 1000X de la misma colonia, se usó azul de metileno para lograr un mejor contraste. Foto: G. Arévalo, 2009.

### 3.3.4 Géneros aislados de la rizósfera de *Cypera bipartitus*

Cuadro 3.12.- Pruebas bioquímicas de identificación para el primer género bacteriano aislado a partir del suelo rizosférico de *Cypera bipartitus*.

OBSERVACIÓN MACROSCÓPICA DE LA COLONIA	RESULTADO
Tamaño de la colonia	3 - 5 mm
Forma	Redonda
Elevación	Convexa
Margen	Regular
Color	Blanca
Superficie	Opaca
Densidad	Abundante
Consistencia	Butirosa
OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA	
Coloración Gram	Positiva
Esporas	+
Morfología celular	Bacilos
PRUEBAS BIOQUÍMICAS	
Oxidasa	-
Catalasa	+
OF Anaerobiosis	-
OF Aerobiosis	+
Pigmento amarillo	+
Manitol	+
Lecitinasa	-
Rojo de metilo	-
VP	+
Sulfuro	-
Indol	-
Movilidad	-
Nitratos	+
Urea	+
TSI	K/A
Citrato	+
Gelatina	+
Esculina	-
Almidón	+
<b>BACTERIA</b>	<b>Bacillus spp. (2)</b>

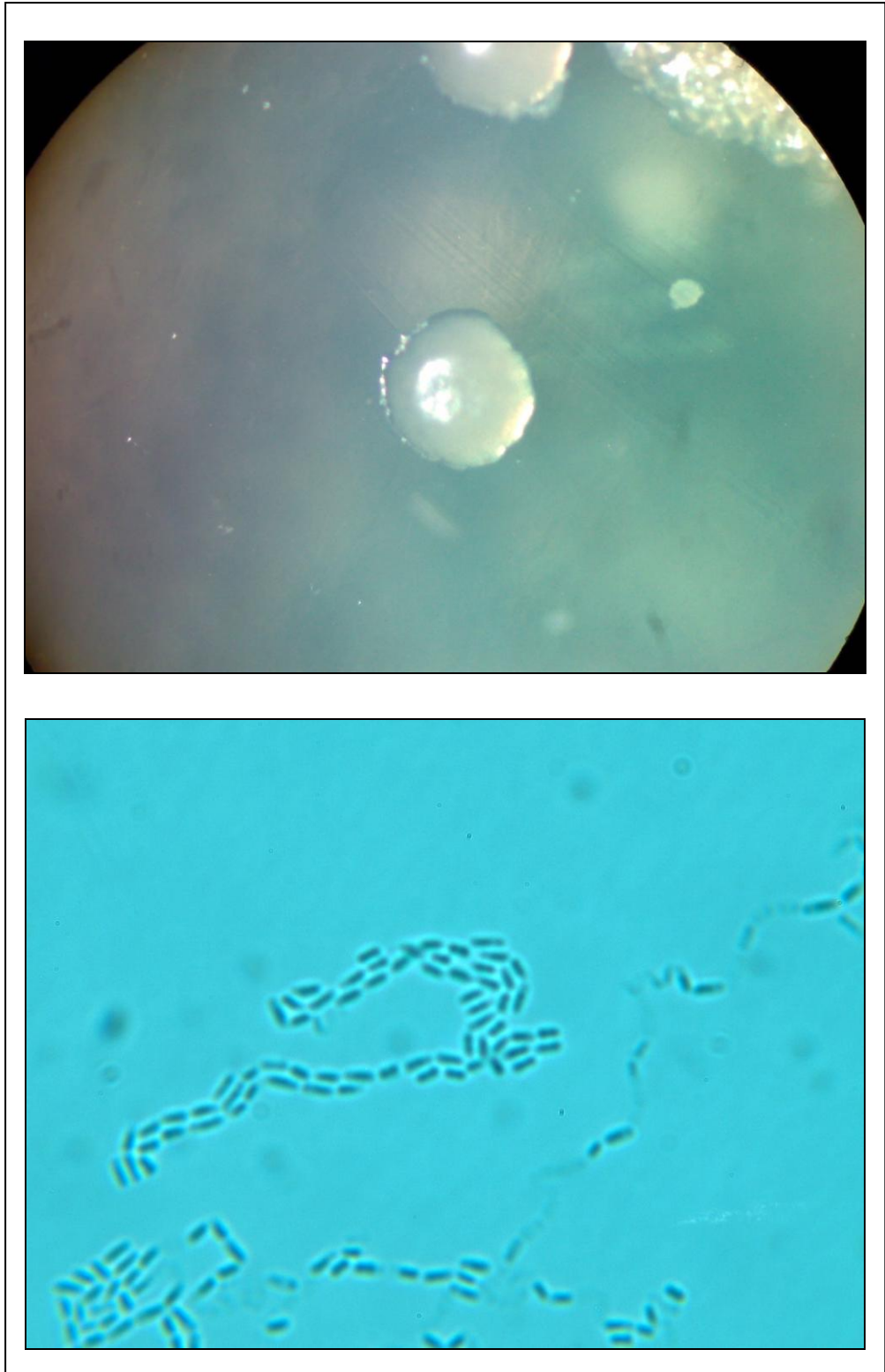


*Figura 3.10.- Arriba: detalle de la colonia de Bacillus spp. (2). Abajo: fotografía microscópica 1000X de la misma colonia. Foto: G. Arévalo, 2009.*

Cuadro 3.13.- Pruebas bioquímicas de identificación para el segundo género bacteriano aislado a partir del suelo rizosférico de *Cypera bipartitus*.

OBSERVACIÓN MACROSCÓPICA DE LA COLONIA	RESULTADO
Tamaño de la colonia	1 - 3 mm
Forma	Circular
Elevación	Plana
Margen	Entera
Color	Anaranjado
Superficie	Brillante
Densidad	Escasa
Consistencia	Butirosa
OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA	
Coloración Gram	Negativa
Esporas	-
Morfología celular	Bacilos
PRUEBAS BIOQUÍMICAS	
Oxidasa	+
Catalasa	+
OF Anaerobiosis	+
OF Aerobiosis	-
Pigmento amarillo	+
Rojo de metilo	-
VP	-
Sulfuro	-
Indol	-
Movilidad	+
Nitratos	-
Urea	-
TSI	K/K
Citrato	+
Gelatina	-
Esculina	-
Almidón	-
<b>BACTERIA</b>	<b>Xantomona spp.</b>





*Figura 3.11.- Arriba: detalle de la colonia de Xantomona spp. Abajo: fotografía microscópica 1000X de la misma colonia, se usó azul de metileno para lograr un mejor contraste. Foto: G. Arévalo, 2009*

### 3.4 Selección de microorganismos para bioadición

El total de 11 géneros bacterianos aislados de las distintas especies vegetales. Fueron sembrados por duplicado en cajas petri conteniendo el agar extracto de tierra. Luego de 24 horas de incubación a 28°C se observaron la formación o ausencia de colonias.

Se notó la formación de colonias por parte de 6 géneros bacterianos, los cuales fueron capaces de crecer normalmente, a saber, *Pseudomonas spp.* (1), *Acinetobacter spp.*, *Flavobacterium spp.* (1), *Bacillus spp.* (2), *Xantomona spp.* y *Bacillus subtilis*. Esta fase permitió seleccionar a los géneros bacterianos aptos para asimilar los elementos presentes en el medio y consecuentemente en los lechos filtrantes. Los resultados de esta fase se resumen en el Cuadro 3.14. El crecimiento de los distintos géneros se puede apreciar en la Figura 3.11.

Cuadro 3.14.- Crecimiento ( + ó - ) en el medio extracto de tierra de todos los géneros bacterianos aislados de la rizósfera de las distintas especies vegetales.

Planta	Género bacteriano	Crecimiento en medio
<i>Vetiver</i> ( <i>Chrysopogon zizanioides</i> )	<i>Pseudomonas spp.</i> (1)	+
	<i>Acinetobacter</i>	+
	<i>Pseudomonas spp.</i> (2)	-
	<i>Flavobacterium spp.</i> (1)	+
<i>Carex lemanianna</i>	<i>Pseudomonas spp.</i> (3)	-
	<i>Flavobacterium spp.</i> (2)	-
	<i>Bacillus spp.</i> (1)	-
<i>Cypera bipartitus</i>	<i>Bacillus spp.</i> (2)	+
	<i>Xantomona spp.</i>	+
<i>Eleocharys elegans</i>	<i>Flavobacterium spp.</i> (3)	-
	<i>Bacillus subtilis</i>	+

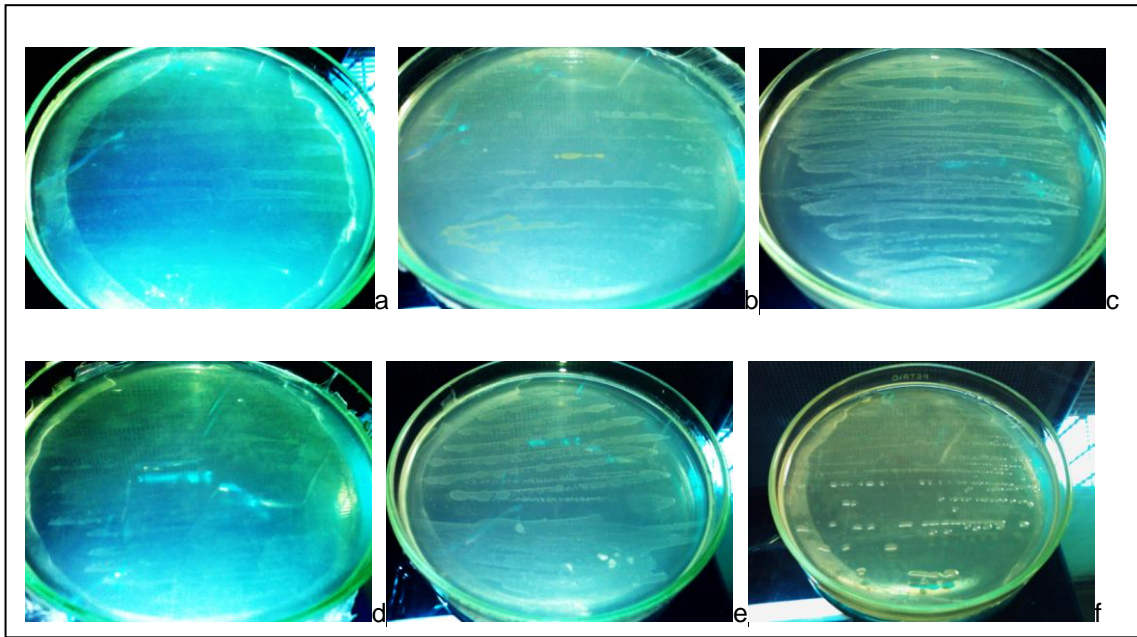


Figura 3.12.- Cajas Petri con medio Extracto de tierra, se puede apreciar la presencia de colonias de *Pseudomonas spp.* (1) (a); *Acinetobacter spp.* (1) (b); *Flavobacterium spp.* (1) (c); *Bacillus spp.* (2) (d); *Xantomona spp.* (e) y *Bacillus subtilis* (f) . Fotos: G. Arévalo, 2009.

### 3.5 Proliferación masiva

Como puede apreciarse en la Figura 3.13, la fase de proliferación masiva permitió obtener una suspensión bacteriana ultra-concentrada (concentración mayor a  $10^8$  UFC/ml) de cada género bacteriano seleccionado; esta suspensión está lista para ser aplicada directamente en las raíces de las plantas de acuerdo al procedimiento establecido.



Figura 3.13.- Suspensiones bacterianas (1L) obtenidas por proliferación masiva. Foto: G. Arévalo, 2009.

### 3.6 Análisis de agua al final del tratamiento

El análisis de agua se practicó una semana después de la inoculación de los géneros bacterianos seleccionados para el tratamiento, éstos se muestran en el Cuadro 3.15.

*Cuadro 3.15.- Resultados de análisis de agua practicados una semana después de la bioadición de los géneros bacterianos seleccionados. Los valores negativos (-) indican cantidades menores a las presentadas.*

<b>Influyente</b>			
<b>Ensayo</b>	<b>Unidades</b>	<b>Valor Límite Permisible</b>	<b>Resultado</b>
pH	Unid. pH	5<pH<9	6,52
Demanda Química de Oxígeno	mg/l	<80	261
Coliformes Fecales*	NMP/100ml	<1000	-2420
Cloro Libre Residual	mg/l	<2.0	-0,05
Conductividad	µs/cm		343
Nitratos*	mg/l NO3		18,9
Nitrógeno Total*	mg/l NTK		26,4
Sólidos Totales	mg/l		248
Coliformes Totales*	NMP/100ml		-2420
<b>Lecho 1 Eleocharys</b>			
<b>Ensayo</b>	<b>Unidades</b>	<b>Valor Límite Permisible</b>	<b>Resultado</b>
pH	Unid. pH	5<pH<9	7,17
Demanda Química de Oxígeno	mg/l	<80	63
Coliformes Fecales*	NMP/100ml	<1000	-81
Cloro Libre Residual	mg/l	<2.0	-0,08
Conductividad	µs/cm		11,49
Nitratos*	mg/l NO3		2,2
Nitrógeno Total*	mg/l NTK		9,6
Sólidos Totales	mg/l		784
Coliformes Totales*	NMP/100ml		-2420

Cuadro 3.15.- Continuación.

<b>Lecho 2 Carex</b>			
<b>Ensayo</b>	<b>Unidades</b>	<b>Valor Límite Permisible</b>	<b>Resultado</b>
pH	Unid. pH	5<pH<9	6,78
Demanda Química de Oxígeno	mg/l	<80	30
Coliformes Fecales*	NMP/100ml	<1000	6
Cloro Libre Residual	mg/l	<2.0	0,06
Conductividad	µs/cm		765
Nitratos*	mg/l NO3		3,1
Nitrógeno Total*	mg/l NTK		4,2
Sólidos Totales	mg/l		560
Coliformes Totales*	NMP/100ml		-2420
<b>Lecho 3 Cypera</b>			
<b>Ensayo</b>	<b>Unidades</b>	<b>Valor Límite Permisible</b>	<b>Resultado</b>
pH	Unid. pH	5<pH<9	6,75
Demanda Química de Oxígeno	mg/l	<80	35
Coliformes Fecales*	NMP/100ml	<1000	32
Cloro Libre Residual	mg/l	<2.0	-0,05
Conductividad	µs/cm		724
Nitratos*	mg/l NO3		3,1
Nitrógeno Total*	mg/l NTK		4,2
Sólidos Totales	mg/l		312
Coliformes Totales*	NMP/100ml		-2420

### 3.7 Análisis estadístico

#### 3.7.1 Análisis de la población microbológica de la rizósfera

Los datos de conteo de la población microbológica de la rizósfera (Ver Anexo A) fueron analizados a fin de obtener en primer lugar datos de estadística descriptiva, mostrados en el Cuadro 3.16.

Cuadro 3.16.- Estadística descriptiva para la población microbiológica contenida en la rizósfera de las especies vegetales estudiadas; *n*: número de datos evaluados; *E.E.*:error estándar.

Espece vegetal	Variable	<i>n</i>	Media	E.E.	Mín.	Máy.
<i>Chrysopogon zizanioides</i>	UFC/g	36	194444.44	13207.47	0.00	400000.00
<i>Eleocharis elegans</i>	UFC/g	36	866944.44	79595.03	0.00	2000000.00
<i>Carex lemanianna</i>	UFC/g	36	3304722.22	297275.59	0.00	9000000.00
<i>Cypera bipartitus</i>	UFC/g	36	1718333.33	132898.99	0.00	4000000.00

El análisis de varianza (SC tipo III) para el conteo de la población microbiológica se muestra en el Cuadro 3.17. debido a la naturaleza de los datos, estos fueron sometidos a una transformación logarítmica (log+1) a fin de facilitar su análisis.

Cuadro 3.17.- Análisis de varianza (SC tipo III) para el conteo de la población microbiológica contenida en la rizósfera de las especies vegetales estudiadas; *FV*: Fuente de variación; *SC*: Suma de cuadrados; *GL*: Grados de libertad; *CM*: Cuadrado medio; *CV*: Coeficiente de variación; \*\*: Alta significancia.

<b>FV</b>	<b>SC</b>	<b>GL</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>p-valor</b>
<b>Modelo</b>	148.74	5	29.75	259.18	<0.0001**
<b>Especie</b>	148.06	3	49.35	429.99	<0.0001**
<b>Factor de dilución</b>	0.78	2	0.39	3.41	0.0362
<b>Error</b>	14.58	127	0.11	CV = 2.28	
<b>Total</b>	163.32	132			

Con el propósito de ampliar la información estadística, se efectuó una comparación de medias de Duncan (alfa = 0.05) presentada en el cuadro 3.18.

*Cuadro 3.18.- Test de comparación de medias de Duncan ( $\alpha = 0.05$ ) para los valores de UFC/g contenidas en la rizósfera de las especies vegetales estudiadas. Letras distintas (A, B, C, etc.) indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Error = 0.1148; GL = 127.*

Especie	Medias	<i>n</i>	Categorías
<i>Chrysopogon zizanioides</i>	194444.44	36	<b>A</b>
<i>Eleocharis elegans</i>	866944.44	36	<b>B</b>
<i>Cypera bipartitus</i>	1718333.33	36	<b>C</b>
<i>Carex lemanianna</i>	3304722.22	36	<b>D</b>

## 4. CAPÍTULO IV. DISCUSIONES

### 4.1 Análisis de la población microbiológica de la rizósfera

El análisis estadístico de la población bacteriana, contenida en la rizósfera de las distintas especies vegetales analizadas, confirma la marcada diferencia entre la población bacteriana de *Chrysopogon zizanioides* y las demás especies vegetales nativas; este factor es una consecuencia directa de la falta de adaptación de esta planta al clima imperante en la zona de Papallacta, según “The Vetiver Network International” (2009), es necesario tomar en cuenta el hecho de que ésta especie vegetal es originaria de Asia, en localidades cuyo clima fluctúa entre 18 – 25 °C y su crecimiento vegetal inicia a una temperatura mínima de 12°C, estos factores contrastan con el clima frío húmedo de Papallacta.

Vetiver (*Chrysopogon zizanioides*) fue la planta con la menor cantidad de población microbiológica en la rizósfera, comparativamente, su población microbiológica rizosférica es 17 veces más pequeña que la población de *Carex lemanianna*; reflejando de esta manera la pobre adaptación de la planta y el deficiente estado fisiológico en el que se encuentra.

El poco desarrollo vegetal impide que *Chrysopogon zizanioides* sea capaz de mantener una adecuada respiración radical así como también la rizodeposición de productos como CO<sub>2</sub>, iones de bicarbonato, H<sup>+</sup>, electrones libres, etileno, entre otros (Scaife, 2000) además de la secreción de enzimas y fitohormonas, todos estos son factores importantes para que la planta pueda sostener una adecuada y surtida población microbiológica. Según Will y Silvia (1990), el incremento del crecimiento vegetal está influenciado, entre otros factores, por fitohormonas microbiológicamente producidas las cuales afectan la morfología de la raíz y la captación de nutrientes que, gracias a los microorganismos, están biodisponibles para la nutrición vegetal.



El análisis comparativo del número de UFC/g mostrado en la Figura 4.1 permite apreciar las diferencias cuantitativas entre las especies vegetales analizadas; el test de Duncan (Ver Cuadro 3.18) confirma la existencia de 4 categorías bien diferenciadas en un orden decreciente: *Carex lemanianna*, *Cypera bipartitus*, *Eleocharis elegans* y por último *Vetiver Chrysopogon zizanioides*.

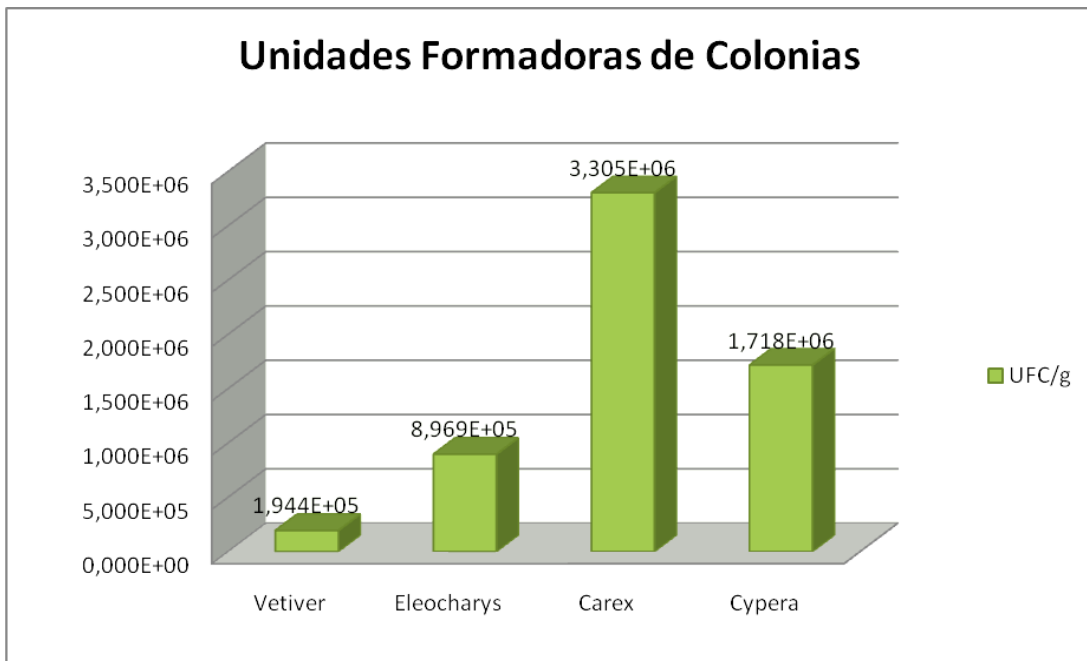


Figura 4.1.- Análisis comparativo de la cantidad de UFC/g de cada una de las especies vegetales estudiadas; *Vetiver* es la especie presente actualmente en los lechos filtrantes, las demás especies son las alternativas vegetales evaluadas.

Datos consultados en The BayScience Fundation (2009) indican que las especies vegetales del género *Carex* representan uno de los más grandes géneros de plantas vasculares perennes, presentes en casi todo el mundo, siendo susceptible de crecer en casi cualquier clima.

En cierto sentido, la riqueza de la población microbiológica contenida en la rizósfera, es consecuencia directa de la adaptación de esta planta a los factores climáticos y edáficos de la zona, lográndose un beneficio mutuo entre planta y microorganismo gracias al intercambio de sus productos metabólicos.

## 4.2 Identificación por pruebas bioquímicas

El análisis bioquímico de las distintas colonias bacterianas aisladas a partir de la rizósfera permitió la identificación únicamente hasta el nivel taxonómico de género, dentro de este contexto, se puede notar que existen varias especies bacterianas agrupadas dentro del mismo género, este detalle permite aseverar lo mencionado, diferenciando tales especies con números entre paréntesis como por ejemplo *Pseudomonas* (1), *Flavobacterium* (2), etc.

Se identificaron dos especies de *Pseudomonas*; *Pseudomonas* (1) se diferencia de *Pseudomonas* (2) debido a que sus pruebas de urea y citrato son positivas, en tanto que las pruebas de manitol y degradación de glucosa son negativas; adicionalmente, el crecimiento en agar McConkey de *Pseudomonas* (1) produjo colonias translúcidas.

*Flavobacterium* (1) se diferencia de *Flavobacterium* (2) y (3) en que sus pruebas de manitol, nitratos, RM, degradación de glucosa y crecimiento en McConkey los resultados fueron positivos, además de diferir en el tamaño, elevación y color de la colonia.

*Bacillus* (1) se diferencia de *Bacillus* (2) en sus pruebas de gelatina, nitratos y degradación de almidón, las cuales son todas positivas, adicionalmente, ambas especies difieren en las características macroscópicas de sus colonias.

## 4.3 Selección de microorganismos para bioadición

El agar extracto de tierra constituye un medio ideal para probar las limitaciones metabólicas que pueden enfrentar distintos tipos de géneros bacterianos al ser inoculados en el mismo, debido a que no contiene ningún suplemento nutricional agregado en el laboratorio, a excepción del agar que actúa únicamente como agente solidificante.

El agua usada en la preparación del medio fue la que ingresa al sistema de lechos filtrantes después de un tratamiento previo de sedimentación; este líquido contiene elementos como residuos de grasa, detergentes y jabones, ácidos débiles, macro y microorganismos, gases disueltos como CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>S, NH<sub>3</sub>, entre otros; los cuales constituyen las diferentes fuentes de nutrientes que fueron usados por los 6 géneros bacterianos que tuvieron la capacidad de formar colonias en este medio. Estas bacterias se seleccionaron en base al criterio que indica que su capacidad de crecimiento se debe a la exitosa absorción y transformación de los compuestos presentes en el agua así como también aquellos presentes en el suelo de los lechos filtrantes que se pretende optimizar.

#### **4.4 Proliferación masiva**

La formulación del medio de proliferación masiva usado en este proyecto, fue modificado específicamente en los componentes que constituyen las fuentes de carbono que serán usadas por los géneros bacterianos previamente seleccionados.

La modificación en la formulación del medio de Jaanis (2007) fue realizada en función de los resultados de las pruebas bioquímicas de identificación, donde se nota que varios de los géneros bacterianos seleccionados no poseen una capacidad glucolítica, es decir, no pueden usar únicamente la glucosa como fuente directa de carbono, por lo que fue sustituida en proporciones equitativas de dextrosa y sacarosa, esta modificación amplía las opciones de fuentes de carbono para aquellos géneros bacterianos que así lo requieran.

La proliferación masiva debe llevarse a cabo de manera individual para cada género bacteriano seleccionado, evitando de esta manera las interacciones de competencia por nutrientes que se pueden dar entre las bacterias de géneros distintos y la potencial disminución de la concentración bacteriana de la suspensión.

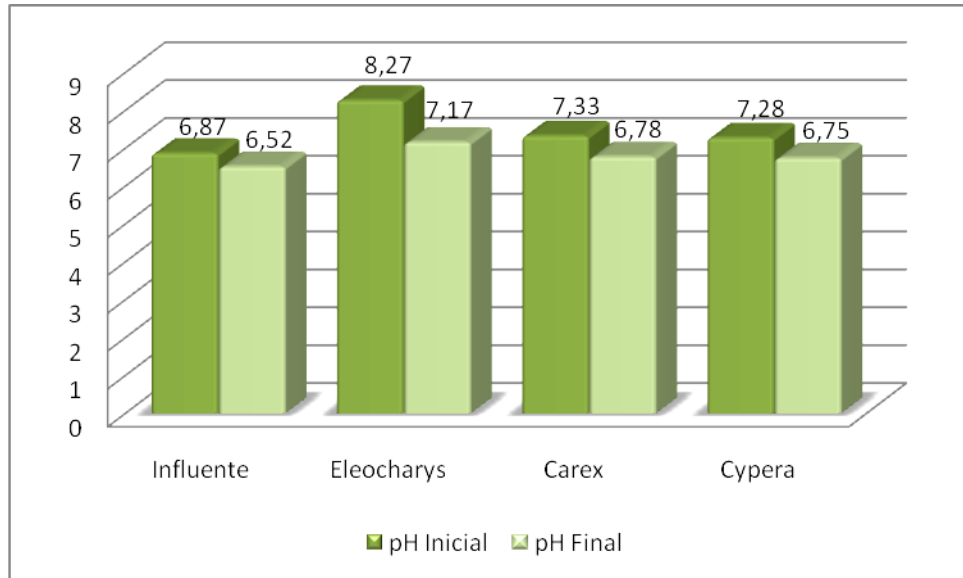
La tensión superficial de los medios de cultivo líquidos afecta al desarrollo de un microorganismo. Por ejemplo *Bacillus subtilis* tiende a crecer en la superficie a modo de película o velo en los medios corrientes con una tensión superficial entre 57 y 63 dinas, pero si se disminuye a menos de 40 dinas por el agregado de un surfactante esta crece en forma difusa. La capacidad de humectación de un material es función de la tensión superficial. Las soluciones con surfactantes pueden penetraren grietas y espacios muy pequeños e incluso hasta el centro de los agregados de bacterias, donde el medio liquido sin surfactantes quedaría por encima sin mostrar penetración alguna (Carrillo, 2003).

En volúmenes relativamente grandes de suspensión bacteriana (mayores a 500 mL), un factor crucial a controlar es la tensión superficial, la célula bacteriana tiene que vencer la barrera física de la interfase formada entre solido (pared celular) y liquido (medio de cultivo), siendo este un obstáculo para la captación de los distintos elementos esenciales para su metabolismo. Tween 80, un surfactante hidrofílico no iónico, usado como parte del medio de proliferación, permitió la reducción de la tensión superficial del medio liquido, constituyendo de esta manera una práctica solución que permita a las bacterias la fácil captación de nutrientes.

#### **4.5 Análisis de agua al final del tratamiento**

Un monitoreo de las descargas de agua luego de una semana de haber inoculado las bacterias más apropiadas para el tratamiento, permitió evaluar la eficiencia global del tratamiento, los análisis de agua se realizaron en base a los requerimientos de la ley RAOH 1215, específicamente la tabla 5 cuyos parámetros y límites permisibles constan en la Figura 2.1.

El análisis comparativo de los resultados se resume en las figuras siguientes:



*Figura 4.2.- Comparación de los valores de pH en el agua. Las muestras se tomaron al ingreso (influyente) y a la salida de los contenedores de cada especie vegetal. Los valores hacen referencia al estado inicial (antes de la bioadición) y final (después de la bioadición) en las especies vegetales.*

Se puede notar que los valores de pH se mantienen dentro de un rango estable, decreciendo levemente después de la bioadición, Según Jaanis (2007), el pH puede presentar variaciones significativas en el caso de haberse dado un desequilibrio entre los productos metabólicos tanto de las plantas como de las bacterias inoculadas en la rizósfera, pero éste no es el caso, demostrando que la bioadición no influye de manera significativa en los cambios de pH del agua a tratar.

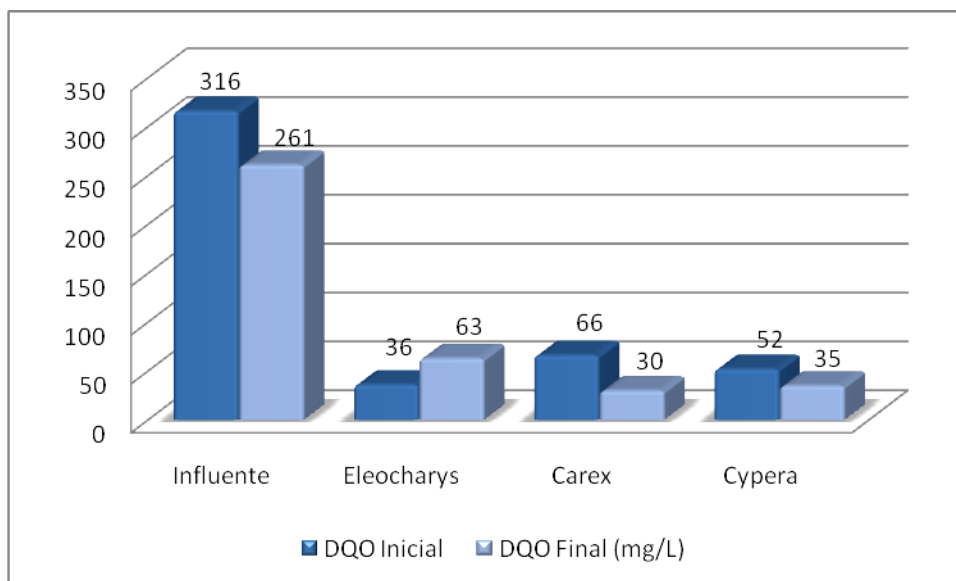


Figura 4.3.-Comparación de los valores de Demanda Química de Oxígeno DQO en el agua. Las muestras se tomaron al ingreso (influyente) y a la salida de los contenedores con de cada especie vegetal. Los valores hacen referencia al estado inicial (antes de la bioadición) y final (después de la adición) en las especial vegetales.

El parámetro crítico en el sistema de tratamiento de aguas negras es la Demanda Química de Oxígeno, un sistema de tratamiento eficaz debe ser capaz de lograr una reducción de este valor con respecto al influente y mantenerlo dentro de los valores permisibles, que según la RAOH 1215 debe ser menor a 80 mg/L. Enfocándonos en la especie *Carex lemanianna* (ver Figura 4.2.), el valor de 66 mg/L que se registra antes de la bioadición se ve reducido en un 45.5% después de la bioadición, caso similar sucede con la especie *Cypera bipartitus*.

En contraste, la especie *Eleocharys elegans* muestra que la bioadición influye negativamente en la remoción de DQO; si bien es cierto, de los dos géneros bacterianos que fueron aislados de las raíces de *Eleocharys*, un solo género (*Bacillus subtilis*) fue seleccionado para la optimización del tratamiento.

*Eleocharys elegans* es una especie vegetal de raíces acuáticas o subacuáticas, cuya rizósfera requiere la presencia de microorganismos específicos para este medio, de esta manera, *Eleocharys* no fue capaz de mantener de una forma exitosa la combinación de géneros bacterianos que le

fueron inoculados, al darse este fenómeno, la bioadición no es la estrategia más conveniente en la optimización del sistema de tratamiento, salvo que se inoculen microorganismos exclusivos de la rizósfera de esta planta, lo cual puede ser motivo de estudios futuros.

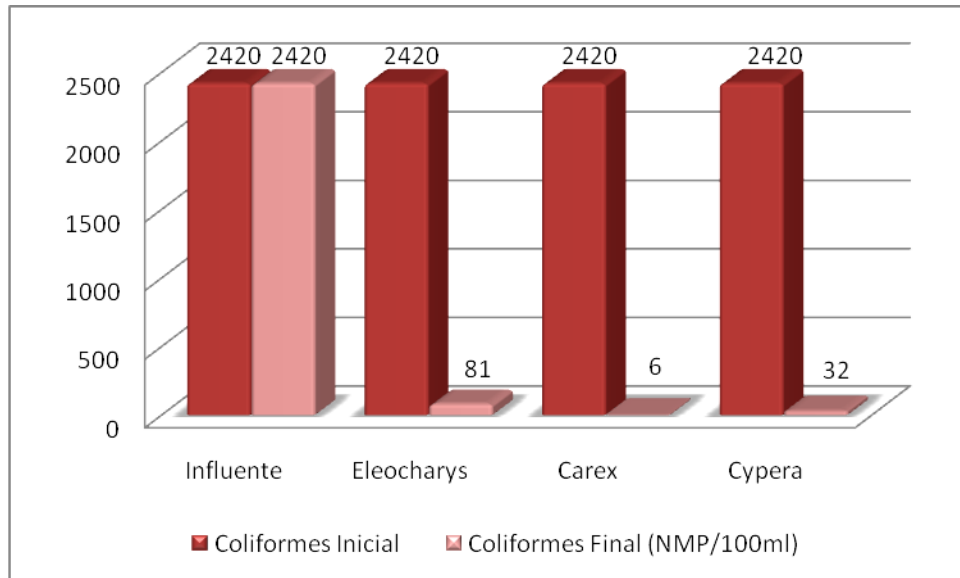


Figura 4.4.- Comparación de los valores de Coliformes Totales en el agua. Las muestras se tomaron al ingreso (influyente) y a la salida de los contenedores con de cada especie vegetal. Los valores hacen referencia al estado inicial (antes de la bioadición) y final (después de la adición) en las especial vegetales.

Dentro del tratamiento, la adición de una suspensión bacteriana ultra concentrada (concentración mayor a  $10^8$ UFC/ml) asegura la supervivencia de los microorganismos introducidos frente a otros presentes en la rizósfera. La Figura 4.3. muestra la reducción en el número de coliformes totales muy por debajo del límite permisible (<1000) después de bioadicionar los géneros bacterianos seleccionados, la reducción mínima es del 96.7% en el caso de *Eleocharys elegans* hasta observar una reducción del 99.8% en el caso de *Carex lemanianna*, esto concuerda con los resultados obtenidos en un proyecto complementario por Cevallos (2009) donde se comprobó que *Carex* es la especie vegetal más apropiada tanto en la adaptación al clima como también en las condiciones de los lechos filtrantes.

La bioadición permitió la reducción de coliformes por mecanismos como la competencia por nutrientes entre los coliformes y las bacterias introducidas, adicionalmente, el aumento de la concentración de oxígeno disuelto (consecuencia directa de la reducción de DQO) en el área de la rizósfera e incluso depredación por parte de las bacterias introducidas en acción conjunta con algas y protozoarios (Cunningham, 1995).

Cabe mencionar que las bacterias rizosféricas introducidas producen metabolitos que constituyen componentes tóxicos para organismos coliformes y demás patógenos. Todos estos factores garantizan la eliminación biológica de coliformes, hecho que puede llevar a la supresión de la eliminación química por cloración como último paso para la eliminación de estos patógenos y evitar de esta forma el inconveniente que se puede presentar por la presencia de cloro libre residual en el efluente final de los lechos filtrantes.



## 5. CAPÍTULO V. CONCLUSIONES

El uso conjunto de plantas y bacterias nativas bioadicionadas garantiza el éxito de un plan de mejora para el tratamiento de aguas negras y grises en los lechos filtrantes.

La especie vegetal ensayada como alternativa *Carex lemanianna* posee la mayor cantidad de unidades formadoras de colonias contenidas por gramo de suelo rizosférico (UFC/g), como consecuencia de la amplia distribución y exitosa adaptación a las condiciones climáticas imperantes en la zona de Papallacta, siendo ésta una alternativa eficaz desde el punto de vista tanto botánico como microbiológico para ser aplicada en el sistema de tratamiento de lechos filtrantes de la estación Páramo PS4 de OCP.

La siembra de la especie vegetal *Carex lemanianna*, en bioadición de los géneros bacterianos *Pseudomonas spp.(1)*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium spp.(1)*, *Bacillus spp.(2)*, *Xantomona spp.* y *Bacillus subtilis*, constituye la mejor asociación simbiótica que permite la reducción de DQO en un 88.5% y coliformes en un 99.8%, cumpliendo de esta manera con la normativa RAOH 1215.

El medio mineral modificado fue apto para la proliferación masiva y constituye también un vehículo óptimo para la fácil introducción dirigida de las bacterias seleccionadas en la rizósfera de las plantas presentes en los lechos filtrantes.

## **6. CAPÍTULO VI. RECOMENDACIONES**

El método de conteo directo de Unidades Formadoras de Colonias en placa con agar nutriente debe ser considerado como el más apto frente a los métodos indirectos.

Es recomendable la identificación taxonómica hasta el nivel de especie, con el propósito de disponer de la información más completa que permita el correcto manejo de las cepas bacterianas y evitar la introducción de posibles patógenos en la bioadición.

La proliferación masiva de géneros bacterianos debe realizarse de manera individual para cada especie a fin de evitar el sinergismo y garantizar una adecuada concentración celular en la suspensión bacteriana resultante.

El sistema de tratamiento de lechos filtrantes debe realizar la bioadición como herramienta biológica para la eliminación de DQO y coliformes suprimiendo el uso de pastillas de cloro.

## 7. CAPÍTULO VII. BIBLIOGRAFÍA

Acero Nuria. (1997). Estudio de las rizobacterias de *Vicia villosa*: optimización de la productividad por técnicas biológicas. Madrid: Universidad San Pablo.

Alexander, M. (1990). Introduction to Soil Microbiology. New York: John Wiley & Sons.

Anderson, T., Guthrie, E., and Walton, T. (1993). Bioremediation in the rhizosphere. Environ. Sci. Technol. 27, 2630-2636.

Cevallos, E. (2009). Tres Especies Endémicas de Cyperaceas como Alternativa para Fitotratamiento de Aguas Servidas por Lechos Filtrantes en la Estación Páramo PS4, OCP.

Cunningham, S.D. , Berti, W.R., Huang, J.W. (1995). Phytoremediation of contaminated soils and sediments. Bioremediation: Science and Applications 145-56.

Chaney, R, Malik, M., Li, Y., Brown, S., Brewer, E., Angle, J. (1997). Phytoremediation of soil metals. Curr. Opin. Biotechnol. 8, 279-284.

ENTRIX. (2007). Séptima Campaña de Monitoreo De los Puntos de Descargas Líquidas en los Terminales, Estaciones y Costa Afuera Del OCP. Quito.

García, T. (2002). Diseño, construcción y evaluación preliminar de un humedal de flujo Subsuperficial. Bogotá: Universidad de Los Andes.

J. Pérez Vargas, G. García Esquivel y F. Esparza García. (2002). Papel ecológico de la flora rizosférica en fitoremediación. Avance y Perspectiva, 21, 297.

Jaanis Juhanson, Jaak Truu, Eeva Heinaru, Ain Heinaru. (2007). Temporal dynamics of microbial community in soil during phytoremediation field experiment. Journal of environmental engineering and landscape management, 4, 213–220

Kuiper Irene, Ellen L. Lagendijk, Guido V. Bloemberg, and Ben J. J. Lugtenberg. (2003). Rhizoremediation: A Beneficial Plant-Microbe Interaction. The American Phytopathological Society. 1, 6–15.

Llagas, A. y Gómez, G. (2006). Diseño de humedales artificiales para el tratamiento de aguas residuales en la UNMSM. Revista del Instituto de Investigaciones FIGMMG. [Versión electrónica] 15, 85-96.

OCP. (2007). Plan de Mejora Tratamiento de Aguas Negras y Grises PS4.

Peter Schröder y Anton Hartmann. (2003). New Developments in Rhizosphere Research (pp: 227). Neuherberg: National Research Center for Environment and Health.

Preetha, R and T. Senthil Kumar. (2008). RHIZOSPHERE TREATMENT TECHNOLOGY FOR COMMUNITY WASTE WATER TREATMENT. Electronic Journal of Enviromental, Agricultural and Food Chemistry. Disponible en: [http://ejeafche.uvigo.es/index.php?option=com\\_docman&task=doc\\_view&gid=329](http://ejeafche.uvigo.es/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=329)

Salt, D.E., Smith, R.D., Raskin, I. (1998). Phytoremediation. Annual Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 49, 643-68.

Sánchez, M. (2004). Microbiología de Suelos, Técnicas, métodos y medios de cultivo. Mexico: Universidad Nacional Autónoma de México.

Scaife Alan (2000). Mineral Nutrition of Crops: Fundamental Mechanisms and Implications. Edited by Z. Rengel. New York: Food Products Press (1999), pp. 399, ISBN 1-56022-880-6.

Sprent, J. (1990). Nitrogen Fixing Organisms. Chapman and Hall. Cambridge: University Press.

TERRY J. GENTRY, CHRISTOPHER RENSING, and IAN L. PEPPER. (2004). New Approaches for Bioaugmentation as a Remediation Technology. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 34, 447–494.

The BayScience Fundation (2009). Carex Genus Overview. Disponible en: [http://zipcodezoo.com/Key/Plantae/Carex\\_Genus.asp#Overview](http://zipcodezoo.com/Key/Plantae/Carex_Genus.asp#Overview)

The Vetiver Network International. (2009). Vetiver Plant and Management. Disponible en: [http://www.vetiver.org/g/the\\_plant.htm](http://www.vetiver.org/g/the_plant.htm)

U.S. Environmental Protection Agency EPA. (1988). Constructed Wetlands and Aquatic Plant Systems for Municipal Wastewater Treatment. Cincinnati: Center for Environmental Research Information.

U.S. Environmental Protection Agency EPA. (2000). Folleto informativo de tecnologías de aguas residuales humedales de flujo Subsuperficial. Center for Environmental Research Information.

Van Dyke, M.I., and Prosser, J.I. (2000). Enhanced survival of *Pseudomonas fluorescens* in soil following establishment of inoculum in a sterile soil carrier. Soil Biol. Biochem, 32, 1377.

Zdenko Rengel. (1999). Mineral nutrition of crops: fundamental mechanisms and implications (pp 20-32). New York: Haworth Press.

## 8. ANEXOS

### 8.1 Anexo A.- datos del conteo de población microbiológica de todas las especies vegetales.

Nº Colonias	Especie	Factor Dilución	UFC/g	Promedio
175	<i>Vetiver</i>	1,00E+03	175000	1,944E+05
200	<i>Vetiver</i>	1,00E+03	200000	
237	<i>Vetiver</i>	1,00E+03	237000	
156	<i>Vetiver</i>	1,00E+03	156000	
273	<i>Vetiver</i>	1,00E+03	273000	
192	<i>Vetiver</i>	1,00E+03	192000	
195	<i>Vetiver</i>	1,00E+03	195000	
181	<i>Vetiver</i>	1,00E+03	181000	
186	<i>Vetiver</i>	1,00E+03	186000	
200	<i>Vetiver</i>	1,00E+03	200000	
171	<i>Vetiver</i>	1,00E+03	171000	
184	<i>Vetiver</i>	1,00E+03	184000	
23	<i>Vetiver</i>	1,00E+04	230000	
20	<i>Vetiver</i>	1,00E+04	200000	
12	<i>Vetiver</i>	1,00E+04	120000	
31	<i>Vetiver</i>	1,00E+04	310000	
24	<i>Vetiver</i>	1,00E+04	240000	
27	<i>Vetiver</i>	1,00E+04	270000	
18	<i>Vetiver</i>	1,00E+04	180000	
13	<i>Vetiver</i>	1,00E+04	130000	
19	<i>Vetiver</i>	1,00E+04	190000	
14	<i>Vetiver</i>	1,00E+04	140000	
21	<i>Vetiver</i>	1,00E+04	210000	
13	<i>Vetiver</i>	1,00E+04	130000	
2	<i>Vetiver</i>	1,00E+05	200000	
3	<i>Vetiver</i>	1,00E+05	300000	
0	<i>Vetiver</i>	1,00E+05	0	
0	<i>Vetiver</i>	1,00E+05	0	
4	<i>Vetiver</i>	1,00E+05	400000	
1	<i>Vetiver</i>	1,00E+05	100000	
2	<i>Vetiver</i>	1,00E+05	200000	
1	<i>Vetiver</i>	1,00E+05	100000	
2	<i>Vetiver</i>	1,00E+05	200000	
2	<i>Vetiver</i>	1,00E+05	200000	
3	<i>Vetiver</i>	1,00E+05	300000	
3	<i>Vetiver</i>	1,00E+05	300000	

Anexo A.- Continuación.

Nº Colonias	Especie	Factor Dilución	UFC/g	Promedio
90	<i>Eleocharys</i>	1,00E+03	900000	8,969E+05
112	<i>Eleocharys</i>	1,00E+03	1120000	
88	<i>Eleocharys</i>	1,00E+03	880000	
87	<i>Eleocharys</i>	1,00E+03	870000	
56	<i>Eleocharys</i>	1,00E+03	560000	
95	<i>Eleocharys</i>	1,00E+03	950000	
93	<i>Eleocharys</i>	1,00E+03	930000	
78	<i>Eleocharys</i>	1,00E+03	780000	
87	<i>Eleocharys</i>	1,00E+03	870000	
84	<i>Eleocharys</i>	1,00E+03	840000	
92	<i>Eleocharys</i>	1,00E+03	920000	
97	<i>Eleocharys</i>	1,00E+03	970000	
10	<i>Eleocharys</i>	1,00E+04	1000000	
12	<i>Eleocharys</i>	1,00E+04	1200000	
13	<i>Eleocharys</i>	1,00E+04	1300000	
8	<i>Eleocharys</i>	1,00E+04	800000	
10	<i>Eleocharys</i>	1,00E+04	1000000	
11	<i>Eleocharys</i>	1,00E+04	1100000	
4	<i>Eleocharys</i>	1,00E+04	400000	
9	<i>Eleocharys</i>	1,00E+04	900000	
10	<i>Eleocharys</i>	1,00E+04	1000000	
7	<i>Eleocharys</i>	1,00E+04	700000	
9	<i>Eleocharys</i>	1,00E+04	900000	
4	<i>Eleocharys</i>	1,00E+04	400000	
1	<i>Eleocharys</i>	1,00E+05	1000000	
0	<i>Eleocharys</i>	1,00E+05	0	
1	<i>Eleocharys</i>	1,00E+05	1000000	
0	<i>Eleocharys</i>	1,00E+05	0	
2	<i>Eleocharys</i>	1,00E+05	2000000	
0	<i>Eleocharys</i>	1,00E+05	0	
1	<i>Eleocharys</i>	1,00E+05	1000000	
1	<i>Eleocharys</i>	1,00E+05	1000000	
2	<i>Eleocharys</i>	1,00E+05	2000000	
0	<i>Eleocharys</i>	1,00E+05	0	
2	<i>Eleocharys</i>	1,00E+05	2000000	
1	<i>Eleocharys</i>	1,00E+05	1000000	

Anexo A.- Continuación.

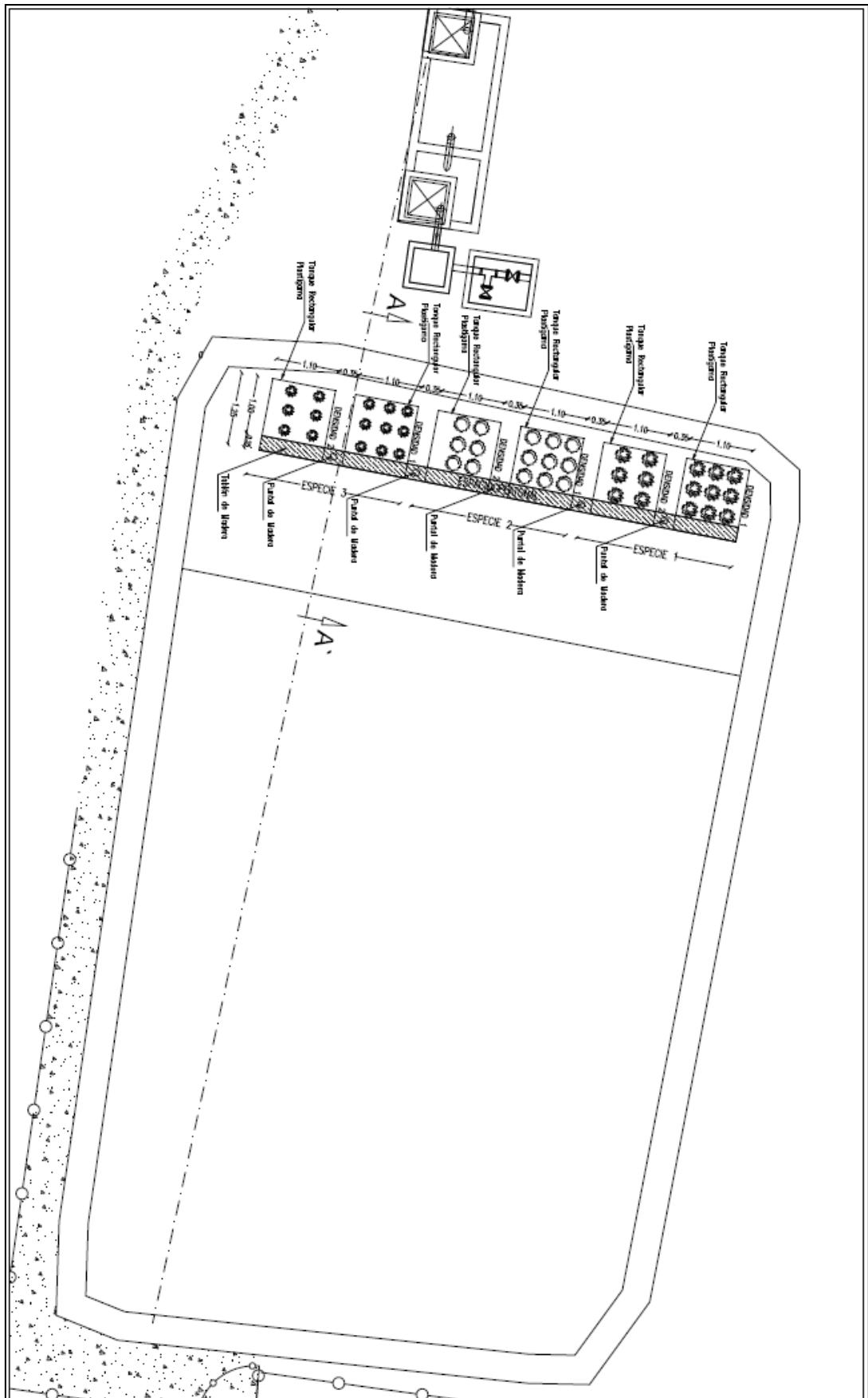
Nº Colonias	Especie	Factor Dilución	UFC/g	Promedio
291	Carex	1,00E+03	2910000	3,305E+06
293	Carex	1,00E+03	2930000	
292	Carex	1,00E+03	2920000	
291	Carex	1,00E+03	2910000	
297	Carex	1,00E+03	2970000	
287	Carex	1,00E+03	2870000	
297	Carex	1,00E+03	2970000	
298	Carex	1,00E+03	2980000	
293	Carex	1,00E+03	2930000	
295	Carex	1,00E+03	2950000	
287	Carex	1,00E+03	2870000	
296	Carex	1,00E+03	2960000	
29	Carex	1,00E+04	2900000	
33	Carex	1,00E+04	3300000	
26	Carex	1,00E+04	2600000	
32	Carex	1,00E+04	3200000	
46	Carex	1,00E+04	4600000	
38	Carex	1,00E+04	3800000	
39	Carex	1,00E+04	3900000	
29	Carex	1,00E+04	2900000	
30	Carex	1,00E+04	3000000	
45	Carex	1,00E+04	4500000	
44	Carex	1,00E+04	4400000	
27	Carex	1,00E+04	2700000	
2	Carex	1,00E+05	2000000	
4	Carex	1,00E+05	4000000	
5	Carex	1,00E+05	5000000	
9	Carex	1,00E+05	9000000	
9	Carex	1,00E+05	9000000	
2	Carex	1,00E+05	2000000	
0	Carex	1,00E+05	0	
1	Carex	1,00E+05	1000000	
2	Carex	1,00E+05	2000000	
3	Carex	1,00E+05	3000000	
0	Carex	1,00E+05	0	
5	Carex	1,00E+05	5000000	

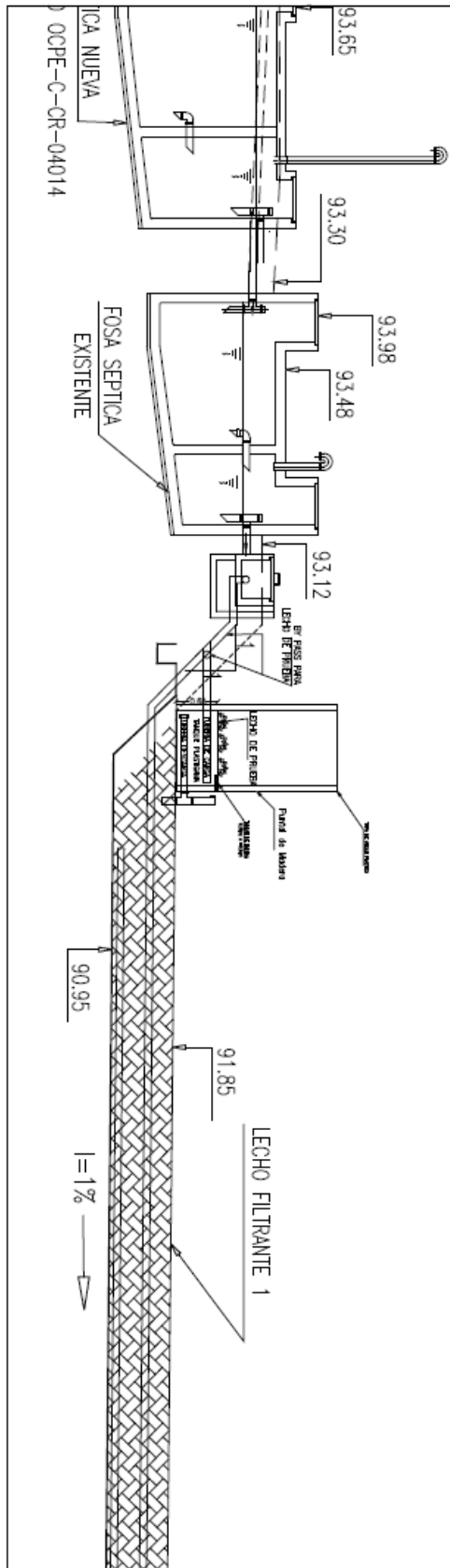


Anexo A.- Continuación.

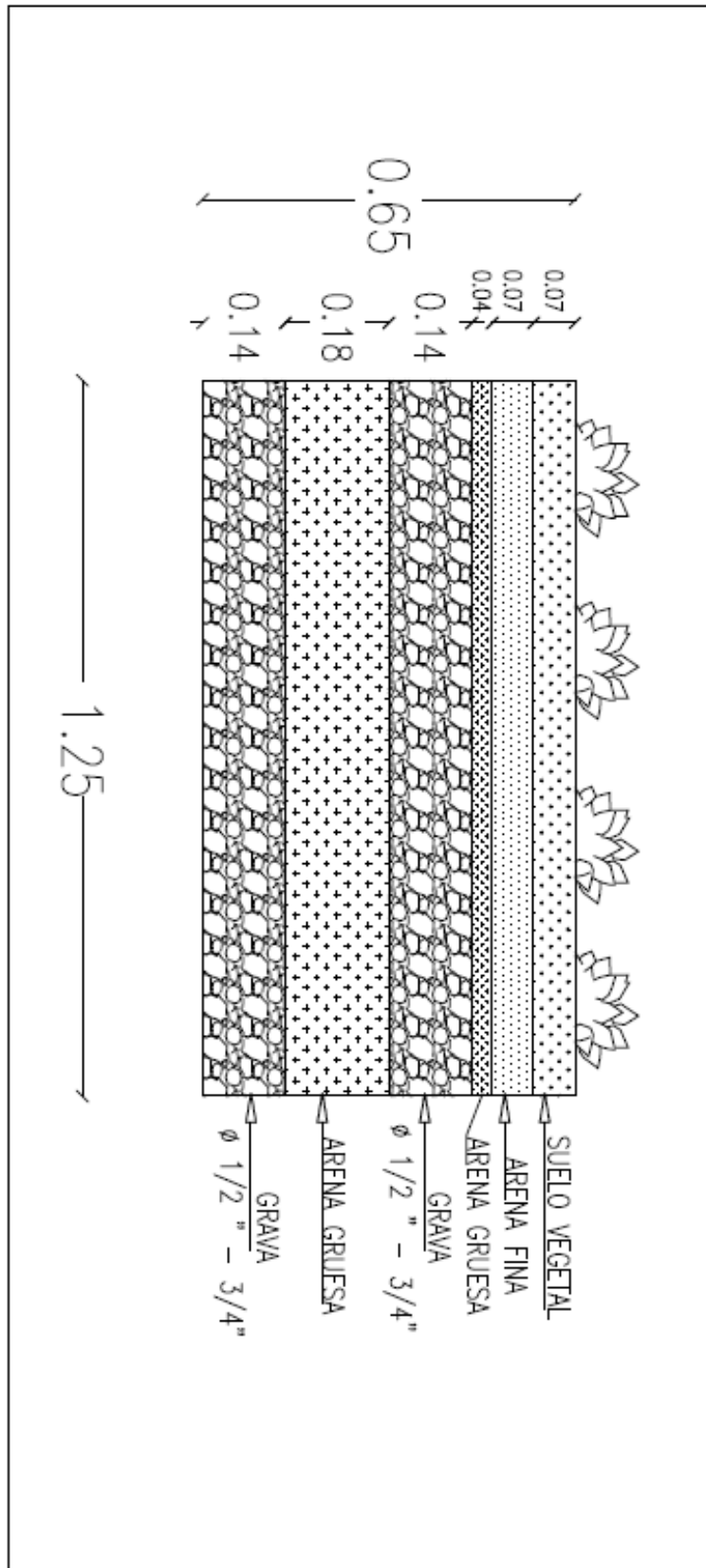
Nº Colonias	Especie	Factor Dilución	UFC/g	Promedio
176	<i>Cypera</i>	1,00E+03	1760000	1,718E+06
171	<i>Cypera</i>	1,00E+03	1710000	
149	<i>Cypera</i>	1,00E+03	1490000	
161	<i>Cypera</i>	1,00E+03	1610000	
157	<i>Cypera</i>	1,00E+03	1570000	
180	<i>Cypera</i>	1,00E+03	1800000	
177	<i>Cypera</i>	1,00E+03	1770000	
172	<i>Cypera</i>	1,00E+03	1720000	
173	<i>Cypera</i>	1,00E+03	1730000	
173	<i>Cypera</i>	1,00E+03	1730000	
169	<i>Cypera</i>	1,00E+03	1690000	
178	<i>Cypera</i>	1,00E+03	1780000	
26	<i>Cypera</i>	1,00E+04	2600000	
20	<i>Cypera</i>	1,00E+04	2000000	
18	<i>Cypera</i>	1,00E+04	1800000	
21	<i>Cypera</i>	1,00E+04	2100000	
14	<i>Cypera</i>	1,00E+04	1400000	
18	<i>Cypera</i>	1,00E+04	1800000	
19	<i>Cypera</i>	1,00E+04	1900000	
12	<i>Cypera</i>	1,00E+04	1200000	
17	<i>Cypera</i>	1,00E+04	1700000	
18	<i>Cypera</i>	1,00E+04	1800000	
16	<i>Cypera</i>	1,00E+04	1600000	
16	<i>Cypera</i>	1,00E+04	1600000	
3	<i>Cypera</i>	1,00E+05	3000000	
3	<i>Cypera</i>	1,00E+05	3000000	
1	<i>Cypera</i>	1,00E+05	1000000	
0	<i>Cypera</i>	1,00E+05	0	
0	<i>Cypera</i>	1,00E+05	0	
0	<i>Cypera</i>	1,00E+05	0	
4	<i>Cypera</i>	1,00E+05	4000000	
2	<i>Cypera</i>	1,00E+05	2000000	
1	<i>Cypera</i>	1,00E+05	1000000	
2	<i>Cypera</i>	1,00E+05	2000000	
1	<i>Cypera</i>	1,00E+05	1000000	
3	<i>Cypera</i>	1,00E+05	3000000	

## 8.2 Anexo B.- Planos de los lechos de prueba.





CORTE A-A LECHO DE PRUEBA OPCION 3  
ESCALA 1:50



**8.3 Anexo C.- Plan de mejora tratamiento de aguas negras y grises PS4**  
propuesto en el año 2007.

	<p align="center"><b>PLAN DE MEJORA</b> TRATAMIENTO DE AGUAS NEGRAS Y GRISES PS4</p>		OCPE-SIG-F-00-02		
			REVISIÓN:	0	
			FECHA:	25-Jul-07	
ÁREA / DEPARTAMENTO:	Ingeniería/ Operaciones/SSA				
RESPONSABLE DEL PLAN DE MEJORA:	OPERACIONES/SSA/INGENIERÍA				
PROCESO:	GESTIÓN DE RIESGOS DE SSA - MANEJO DE DESECHOS				
No. MODO DE FALLA:	PRIORIDAD:	ALTA	X	MEDIA	BAJA
<b>1*. SITUACIÓN ACTUAL</b>					
<p><b>En Páramo</b></p> <p>- Se observa que no existe crecimiento de la vegetación de VETIVER debido a las condiciones climáticas, lo que ha repercutido en la eficiencia del tratamiento. Se ha llevado un seguimiento continuo del crecimiento de la misma y se observa crecimiento radicular pero no en su tallos y hojas. La vegetación se encuentra en un estado de latencia es decir no muerta. El monitoreo de la descarga ha evidenciado un aumento paulatino en la demanda química del oxígeno, DQO (septiembre '06 = 115, noviembre '07=50, diciembre '06= 130 , marzo '07= 143, junio '07 =101 ) mg/l. Lo que confirma la falta de eficiencia de la planta . En el mes de junio del 2007 el monitoreo de cumplimiento legal reporta un valor de 101 mg/l de DQO, encontrándose fuera de los límites permisibles establecidos en el RAOH 1215.</p>					
<b>2**. MEJORA PROPUESTA</b>					
<p>Implementar un tratamiento al efluente del sistema de tratamiento actual para mejorar las características de la descarga. (Ejecución del estudio e implementación de las recomendaciones)</p> <p>Realización del estudio para la optimización del funcionamiento del sistema actual con las siguientes opciones:.</p> <p>(a) Recreación de las condiciones climáticas necesarias para propiciar el crecimiento de la vegetación que soporta el tratamiento, mediante la implementación de un invernadero.</p> <p>(b) Cambio de la vegetación (apropiada de acuerdo al clima y altura)</p> <p>(c) <b>Mejorar el tratamiento previo al ingreso a los lechos con el uso de bacterias</b></p>					
<b>3** OBJETIVO DE LA MEJORA REALIZADA</b>					
Mejorar el sistema de tratamiento de aguas negras y grises en la estación Páramo para garantizar un permanente cumplimiento legal ambiental en las descargas y punto de inmisión					
<b>4. META(S)</b>			<b>5. INDICADOR(ES) DE DESEMPEÑO</b>		
100 % de cumplimiento de parámetros legales establecidos en el Plan de Manejo Ambiental y Reglamento 1215 para descargas líquidas y puntos de inmisión			# de parámetros en incumplimiento = 0		

Anexo C.- Continuación.

6. PLAN DE ACCIÓN				
ACTIVIDADES	RESPONSABLE	RECURSOS	PLAZO	
			PLANIFICAD O	REALIZAD O
1. Inspección de la vegetación	SSA: Coordinador	Coordinador Ambiental	27-jul-07	
2. Estudio para la implementación de un sistema de tratamiento alternativo.	INGENIERÍA: Ingeniero Civil	Ingeniero Civil - Contrato TECNAZUL	10-ago-07	100%
3. Construcción del sistema ALTERNO.	O&M : Superintendente DDV	O&M, DDV	01-sep-07	
2. Definición del tipo de vegetación o alternativa	INGENIERÍA: Ingeniero Civil	Ingeniero Civil	30-sep-07	
3. Construcción de mejoras recomendadas	O&M : Superintendente DDV	O&M, DDV	15-oct-07	
4.- Monitoreo de seguimiento de la calidad del efluente	SSA: Coordinador	Coordinador Ambiental	Permanente Quincenal	
<b>7. COSTO ESTIMADO DEL PROYECTO</b>		<b>10000 USD</b>		
<b>8. FIRMA RESPONSABLE DEL PLAN DE MEJORA</b>		F. Tobar, F. Karolys, R. Bermeo, F. Sánchez, J.Cabrera		
<b>9. NOMBRE Y FIRMA DE REVISIÓN</b>				
<b>10. APROBADO</b>	SI	<b>NOMBRE Y FIRMA:</b> FK	<b>FS</b>	<b>FECHA:</b> 25-ago-07
	NO			

<b>NOTAS:</b>
1* Describir la situación del modo(s) de falla, sus efectos en la empresa y las causas ¿Qué sucede?
2** Describir a partir del conocimiento las causas y consecuencias ¿Que se quiere mejorar por medio del presente Plan?
3*** Describir ¿Cuál es el objetivo de la mejora realizada?

## 8.4 Anexo D.- REGLAMENTO AMBIENTAL PARA LAS OPERACIONES HIDROCARBURÍFERAS EN EL ECUADOR.

### CAPÍTULO XII

#### LÍMITES PERMISIBLES

**ART. 86.**– Parámetros.– Los sujetos de control y sus operadoras y afines en la ejecución de sus operaciones, para descargas líquidas, emisiones a la atmósfera y disposición de los desechos sólidos en el ambiente, cumplirán con los límites permisibles que constan en los Anexos No. 1, 2 y 3 de este Reglamento, los cuales constituyen el programa mínimo para el monitoreo ambiental interno y se reportarán a la Subsecretaría de Protección Ambiental conforme la periodicidad establecida en el artículo 12 de este Reglamento.

En caso de exceder un límite permisible establecido en los anexos, se debe reportar inmediatamente a la Subsecretaría de Protección Ambiental y justificar las acciones correctivas tomadas.

**Tabla 5:** Límites permisibles para descargas de aguas negras y grises.

La periodicidad de los muestreos y análisis será por lo menos semanal, excepto para las fases, instalaciones y actividades de almacenamiento, transporte, comercialización y venta de hidrocarburos, para las cuales se deberá realizar semestralmente.

Parámetro	Expresado en	Unidad	Valor límite permisible
Potencial hidrógeno	pH	---	5<pH<9
Demanda química de oxígeno	DQO	mg/l	<80
Coliformes fecales	Colonias	Col/100 ml	<1000
Cloro residual	Cl <sub>2</sub>	mg/l	<2.0

