

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**OPTIMIZACIÓN DEL SISTEMA DE LECHOS
FILTRANTES PARA BIORREMEDIACIÓN DE AGUAS
NEGRAS Y GRISES MEDIANTE EL USO DE
MICROORGANISMOS RIZOSFÉRICOS NATIVOS EN EL
CAMPAMENTO PÁRAMO PS4-Oleoducto de Crudos
Pesados OCP.**

PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

ELABORADO POR:

GALO FRANCISCO ARÉVALO SALAZAR

SANGOLQUÍ..... DEL 2008

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS

ELABORADO POR

Galo Arévalo

COORDINADOR DE LA CARRERA

Ing. Rafael Vargas

SECRETARIO ACADÉMICO

Ab. Miguel Ramírez.

Lugar y fecha: _____

RESUMEN

La estación Páramo PS4, parte del Oleoducto de Crudos Pesados, constituye un conjunto integral de unidades habitacionales cuya ubicación hizo necesario adoptar un sistema de tratamiento de aguas negras y grises por medio de lechos filtrantes (Una variación de pantano artificial de flujo subsuperficial) para biorremediar los efluentes de esta estación. La solución planteada no tuvo un funcionamiento satisfactorio debido a la falta de adaptación de la especie vegetal aplicada Vetiver (*Chrysopogon zizanioides*), esto factor mostró la necesidad de optimizar el sistema de tratamiento buscando una especie vegetal nativa de la zona así como también aplicar una bioadición de microorganismos rizosféricos aislados a partir de las mismas plantas nativas.

Se estudió la población microbiológica contenida en la rizósfera de las especies vegetales nativas *Eleocharis elegans*, *Carex lemanianna* y *Cypera bipartitus*; notándose que Vetiver (1.944×10^5 UFC/g) tiene una población microbiológica mucho menor que las especies nativas *Eleocharis* (8.969×10^5 UFC/g), *Carex* (3.305×10^6 UFC/g) y *Cypera bipartitus* (1.718×10^6 UFC/g). Se aislaron un total de 11 géneros bacterianos que se identificaron por pruebas bioquímicas y fueron sometidos a pruebas de selección para determinar las especies bacterianas adecuadas para proliferación masiva y la bioadición.

Los géneros *Pseudomonas spp.(1)*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium spp.(1)*, *Bacillus spp.(2)*, *Xantomona spp.* y *Bacillus subtilis* constituyeron el mejor consorcio bacteriano para bioadición en los lechos filtrantes, logrando una reducción de la DQO en un 88.5% y coliformes en un 99.8%, cumpliendo de esta manera con la normativa legal vigente para operaciones hidrocarburíferas.

Palabras clave: *Biorremediación, Microorganismos Rizosféricos, Unidades Formadoras de Colonias UFC, Bioadición.*

ABSTRACT

Páramo station PS4, part of the Heavy Crude Pipeline, is a comprehensive set of housing units whose location made necessary to adopt a system of treatment of sewage and gray through filter beds (A variation of subsurface flow constructed wetlands) in order to bioremediate effluent from this station. The solution presented was not satisfactory due to the lack of adaptations of the plant species applied Vetiver (*Chrysopogon zizanioides*), this factor involve the need to optimize the treatment system using a native plant species to the area as well as implement a rhizospheric microorganisms bioaugmentation with cells isolated from the same native plants.

We studied the microbial population contained in the rhizosphere of native plant species *Eleocharis elegans*, *Carex lemanianna* and *Cypera bipartitus*, noticing that Vetiver (1.944×10^5 CFU/g) has a much lower microbial population than native species *Eleocharis* (8.969×10^5 CFU/g), *Carex* (3.305×10^6 CFU/g) and *Cypera bipartitus* (1.718×10^6 CFU/g). We isolated a total of 11 bacterial genera, wich were identified by biochemical tests and were subjected to screening tests to identify bacterial species suitable for mass proliferation and bioaugmentation.

The genera *Pseudomonas spp* (1), *Acinetobacter*, *Flavobacterium spp.* (1), *Bacillus spp.* (2), *Xanthomonas spp.* and *Bacillus subtilis* were the best for bioaugmentation bacterial consortium for the filter beds, achieving a COD reduction of 88.5% and coliforms in a 99.8%, thus fulfilling the legal regulations for hydrocarbon operations.

Keywords: Bioremediation, Rhizospheric microorganisms, CFU Colony Forming Units, Bioaugmentation.

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICADO

Nosotros Dr. DARWIN RUEDA y Dr. CARLOS CHIRIBOGA

CERTIFICAMOS

Que, la tesis de grado titulada “OPTIMIZACIÓN DEL SISTEMA DE LECHOS FILTRANTES PARA BIORREMEDIACIÓN DE AGUAS NEGRAS Y GRISAS MEDIANTE EL USO DE MICROORGANISMOS RIZOSFÉRICOS NATIVOS EN EL CAMPAMENTO PÁRAMO PS4-Oleoducto de Crudos Pesados OCP.”, realizado por el Sr. GALO FRANCISCO ARÉVALO SALAZAR, ha sido revisado prolijamente y cumple con los requerimientos: teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la ESPE, por lo que nos permitimos acreditarlo y autorizar la entrega al Ing. Rafael Vargas, en su calidad de Director de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología. El trabajo en mención consta de dos ejemplares empastados y dos discos compactos, los cuales contienen el documento en formato portátil de Acrobat (pdf).

Sangolquí, 26 de octubre de 2009

Dr. Darwin Rueda
DIRECTOR

Dr. Carlos Chiriboga
CODIRECTOR

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

Yo, GALO FRANCISCO ARÉVALO SALAZAR

DECLARO QUE:

La tesis de grado titulada **“OPTIMIZACIÓN DEL SISTEMA DE LECHOS FILTRANTES PARA BIORREMEDIACIÓN DE AGUAS NEGRAS Y GRISES MEDIANTE EL USO DE MICROORGANISMOS RIZOSFÉRICOS NATIVOS EN EL CAMPAMENTO PÁRAMO PS4-Oleoducto de Crudos Pesados OCP.”**, ha sido desarrollada con base a una investigación exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, conforme las citas que constan al pie de las páginas correspondientes, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de mi autoría.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance científico del proyecto de grado en mención.

Sangolquí, 26 de octubre de 2009

Galo Arévalo

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN

Yo, GALO FRANCISCO ARÉVALO SALAZAR

Autorizo a la Escuela Politécnica del Ejército la publicación, en la biblioteca virtual de la Institución de la tesis de grado titulada: **“OPTIMIZACIÓN DEL SISTEMA DE LECHOS FILTRANTES PARA BIORREMEDIACIÓN DE AGUAS NEGRAS Y GRISES MEDIANTE EL USO DE MICROORGANISMOS RIZOSFÉRICOS NATIVOS EN EL CAMPAMENTO PÁRAMO PS4-Oleoducto de Crudos Pesados OCP.”**, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Sangolquí, 26 de octubre de 2009

Galo Arévalo

DEDICATORIA

A la Gloria del Gran Arquitecto del Universo.

A toda mi familia, en especial a mis Padres, juntos apuntaron mis sueños y lo único que ahora les puedo devolver es el hecho de compartir este título con ustedes.

Kenneth, Yosseline, Mateo, Fernanda, Diego, Daniel y Sebastian; mis pequeños sobrinos, esperando que en su futuro esté presente siempre la búsqueda de logros basados en el conocimiento de las ciencias.

Yrina, tu amor y tus regaños siempre me recuerdan hacia donde voy y qué es lo que debo lograr.

A mi segunda familia: Mis Amigos, quienes siempre me apoyan, constituyendo la más clara muestra del lado positivo del ser humano.

Para las personas creyentes, Dios está al principio.

Para los científicos está al final de todas sus reflexiones.

Max Planck (1858-1947) Físico alemán.

Galo Arévalo

AGRADECIMIENTOS

Mis sinceros agradecimientos y gratitud a la empresa Oleoducto de Crudos Pesados S.A., al Ing. Francisco Ruíz, Ing. Rodrigo Vaca, Dr. Jaime Cabrera, Silvia Pazmay; a todo el personal de la estación Páramo PS4 y el departamento de SSA por dar su apoyo económico y logístico para la realización de este proyecto, apoyando la investigación científica en el país, mostrando de esta manera que el OCP hace mucho más que transportar petróleo.

Agradezco de manera especial al Dr. Darwin Rueda y al Dr. Carlos Chiriboga por aceptar dirigir esta investigación, por haber prestado toda su experiencia, conocimientos, tiempo y paciencia para el alcance de todos los objetivos planteados; así como también al Ing. Jaime Villacís por prestar su apoyo como biometrista.

Al Instituto Agropecuario Superior Andino IASA I y sus profesores por acogerme como a uno de los suyos y permitirme el uso de sus laboratorios, equipos y reactivos.

Mi agradecimiento y admiración a todos mis profesores de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología quienes depositaron en mí todo el conocimiento y la pasión necesaria para resolver todos los problemas y retos que se presentaron en este proyecto.

Galo Arévalo

ÍNDICE DE CONTENIDOS

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS	II
RESUMEN	III
ABSTRACT	IV
CERTIFICADO	V
DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD	VI
AUTORIZACIÓN	VII
DEDICATORIA	VIII
AGRADECIMIENTOS	IX
ÍNDICE DE CONTENIDOS	X
LISTADO DE CUADROS	XII
LISTADO DE FIGURAS	XV
LISTADO DE ANEXOS	XIX
1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	1
1.2 JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA	2
1.3 OBJETIVOS	4
1.4 MARCO TEÓRICO	4
1.5 SISTEMA DE HIPÓTESIS	15
2. CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS	16
2.1 FASE DE CAMPO	16
2.2 FASE DE LABORATORIO	17
2.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	29

3. CAPÍTULO III. RESULTADOS	32
3.1 ANÁLISIS INICIAL DE AGUA	32
3.2 ANÁLISIS DE POBLACIÓN MICROBIOLÓGICA DE LA RIZÓSFERA	34
3.3 IDENTIFICACIÓN POR PRUEBAS BIOQUÍMICAS	36
3.4 SELECCIÓN DE MICROORGANISMOS PARA BIOADICIÓN	58
3.5 PROLIFERACIÓN MASIVA	59
3.6 ANÁLISIS DE AGUA AL FINAL DEL TRATAMIENTO	60
3.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	61
4. CAPÍTULO IV. DISCUSIONES	64
4.1 ANÁLISIS DE LA POBLACIÓN MICROBIOLÓGICA DE LA RIZÓSFERA	64
4.2 IDENTIFICACIÓN POR PRUEBAS BIOQUÍMICAS	66
4.3 SELECCIÓN DE MICROORGANISMOS PARA BIOADICIÓN	66
4.4 PROLIFERACIÓN MASIVA	67
4.5 ANÁLISIS DE AGUA AL FINAL DEL TRATAMIENTO	68
5. CAPÍTULO V. CONCLUSIONES	73
6. CAPÍTULO VI. RECOMENDACIONES	74
7. CAPÍTULO VII. BIBLIOGRAFÍA	75
8. ANEXOS	78

LISTADO DE CUADROS

- Cuadro 2.1.- Parámetros determinados en el análisis de agua a la entrada del sistema de lechos filtrantes.
- Cuadro 2.2.- Parámetros determinados en el análisis de agua a la entrada del sistema de lechos filtrantes.
- 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.
- Cuadro 3.2.- Resumen de los resultados del análisis de población microbiológica.
- Cuadro 3.3.- Pruebas bioquímicas de identificación para el primer género bacteriano aislado a partir del suelo rizosférico de Vetiver (*Chrysopogon zizanioides*)
- Cuadro 3.4.- Pruebas bioquímicas de identificación para el segundo género bacteriano aislado a partir del suelo rizosférico de Vetiver (*Chrysopogon zizanioides*)
- Cuadro 3.5.- Pruebas bioquímicas de identificación para el tercer género bacteriano aislado a partir del suelo rizosférico de Vetiver (*Chrysopogon zizanioides*)
- Cuadro 3.6.- Pruebas bioquímicas de identificación para el cuarto género bacteriano aislado a partir del suelo rizosférico de Vetiver (*Chrysopogon zizanioides*).
- Cuadro 3.7.- Pruebas bioquímicas de identificación para el primer género bacteriano aislado a partir del suelo rizosférico de *Eleocharis elegans*.

- Cuadro 3.8.- Pruebas bioquímicas de identificación para el segundo género bacteriano aislado a partir del suelo rizosférico de *Eleocharis elegans*.
- Cuadro 3.9.- Pruebas bioquímicas de identificación para el primer género bacteriano aislado a partir del suelo rizosférico de *Carex lemanianna*.
- Cuadro 3.10.- Pruebas bioquímicas de identificación para el segundo género bacteriano aislado a partir del suelo rizosférico de *Carex lemanianna*.
- Cuadro 3.11.- Pruebas bioquímicas de identificación para el tercer género bacteriano aislado a partir del suelo rizosférico de *Carex lemanianna*.
- Cuadro 3.12.- Pruebas bioquímicas de identificación para el primer género bacteriano aislado a partir del suelo rizosférico de *Cypera bipartitus*.
- Cuadro 3.13.- Pruebas bioquímicas de identificación para el segundo género bacteriano aislado a partir del suelo rizosférico de *Cypera bipartitus*.
- 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.
- 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.

- 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.
- 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.
- 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 ($p \leq 0.05$). Error = 0.1148; GL = 127.

LISTADO DE FIGURAS

- 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.
- Figura 1.2.- sección transversal típica de un humedal artificial de flujo Subsuperficial. Fuente: García, 2002.
- Figura 1.3.- resumen de las diferentes tecnologías de bioadición. Fuente: Terry, 2004.
- 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.
- Figura 2.2.- Esquema del procedimiento de conteo de la población microbiana de la rizósfera. Modificado de Acero, 1997.
- 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.
- 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.

- Figura 2.5.- Conteo de UFC/g usando un contador de campo oscuro LEICA-Quebec. Foto: G. Arévalo, 2009.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Figura 3.5.- Arriba: detalle de la colonia de *Flavobacterium* spp.. Abajo: fotografía microscópica 1000X de la misma colonia. Foto: G. Arévalo, 2009.
- Figura 3.6.- Arriba: detalle de la colonia de *Bacillus subtilis*. Abajo: fotografía microscópica 1000X de la misma colonia. Foto: G. Arévalo, 2009.

- 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.
- 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.
- 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.
- Figura 3.10.- Arriba: detalle de la colonia de *Bacillus* spp. (2). Abajo: fotografía microscópica 1000X de la misma colonia. Foto: G. Arévalo, 2009.
- 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.
- 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.
- Figura 3.13.- Suspensiones bacterianas (1L) obtenidas por proliferación masiva. Foto: G. Arévalo, 2009.

- 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.
- 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.
- Figura 4.3.-Comparacion 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.
- 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.

LISTADO DE ANEXOS

- Anexo A.- datos del conteo de población microbiológica de todas las especies vegetales.
- Anexo B.- Planos de los lechos de prueba.
- Anexo C.- Plan de mejora tratamiento de aguas negras y grises PS4 propuesto en el año 2007.
- Anexo D.- REGLAMENTO AMBIENTAL PARA LAS OPERACIONES HIDROCARBURÍFERAS EN EL ECUADOR.