

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS “ESPE” DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERA BIOTECNÓLOGA

«Aislamiento, caracterización e identificación de al menos una especie microbiana facultativa que pueda degradar materia orgánica presente en los tratamientos biológicos de una planta de tratamiento de agua residual (PTAR) ubicada en Quito, provincia de Pichincha.»

Autora: Carmen Lisette Arias Santos

Tutor: Rosa Fabiola Albuja Yáñez M. Sc.

08 de Marzo de 2024



ÍNDICE DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

MATERIALES Y MÉTODOS

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CONCLUSIONES

RECOMENDACIONES

AGRADECIMIENTOS



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

INTRODUCCIÓN

Crecimiento de población urbana



Gran cantidad de desechos sólidos



Eliminados y desechados diariamente en vertederos y rellenos sanitarios



- **Mundialmente** : 2010 millones de toneladas
- **Nivel Nacional** : 12 613 toneladas
- **Ciudad de Quito**: 150 000 toneladas aproximadamente

Lixiviados

- Composición bastante compleja.
- Materia orgánica e inorgánica de todo tipo
- Efluentes acuosos que se originan por la filtración de agua lluvia y varios procesos de reacciones bioquímicas

INTRODUCCIÓN



Planta de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR)

Reducción o eliminación parcial o total de los contaminantes de los cuerpos de agua.

Remoción puede ser:

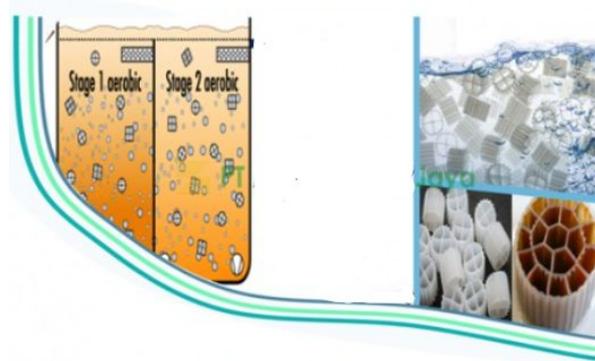
- Física
- Química
- Biológica

Bioaumentación

Uso de microorganismos para la eliminación de materia orgánica biodegradable

Microorganismos:

- Aerobios
- Anaerobios
- Facultativos



Reactor MBBR

- Proceso biológico y aerobio que permite una alta remoción de contaminantes
- Combina tecnologías de lodos activados y biopelícula
- Reactor con apertura superior
- Según el volumen, 50 a 70% de chips plásticos (carrier)
- Carrier ayuda a generar biopelícula

OBJETIVOS

Objetivo general del Proyecto

Aislar, caracterizar e identificar al menos una especie microbiana facultativa que pueda degradar materia orgánica presente en los tratamientos biológicos de una planta de tratamiento de agua residual (PTAR), ubicada en Quito, provincia de Pichincha.

Objetivos Específicos

- Identificar los tipos de tratamientos biológicos existentes en una PTAR mediante una investigación bibliográfica para conocer su funcionamiento.
- Realizar tomas de muestras de agua residual cruda de la planta de tratamiento a escala siguiendo un plan de muestreo, para el aislamiento e identificación de al menos un microorganismo facultativo existente.
- Caracterizar al menos un microorganismo encontrado en los diferentes medios con la ayuda de pruebas bioquímicas y moleculares, para establecer su funcionalidad en la biodegradación de contaminantes en residuos líquidos
- Establecer la tasa de biodegradación de los microorganismos identificados, mediante la comparación de valores iniciales y finales de los parámetros de cargas orgánicas para conocer su eficiencia degradadora.

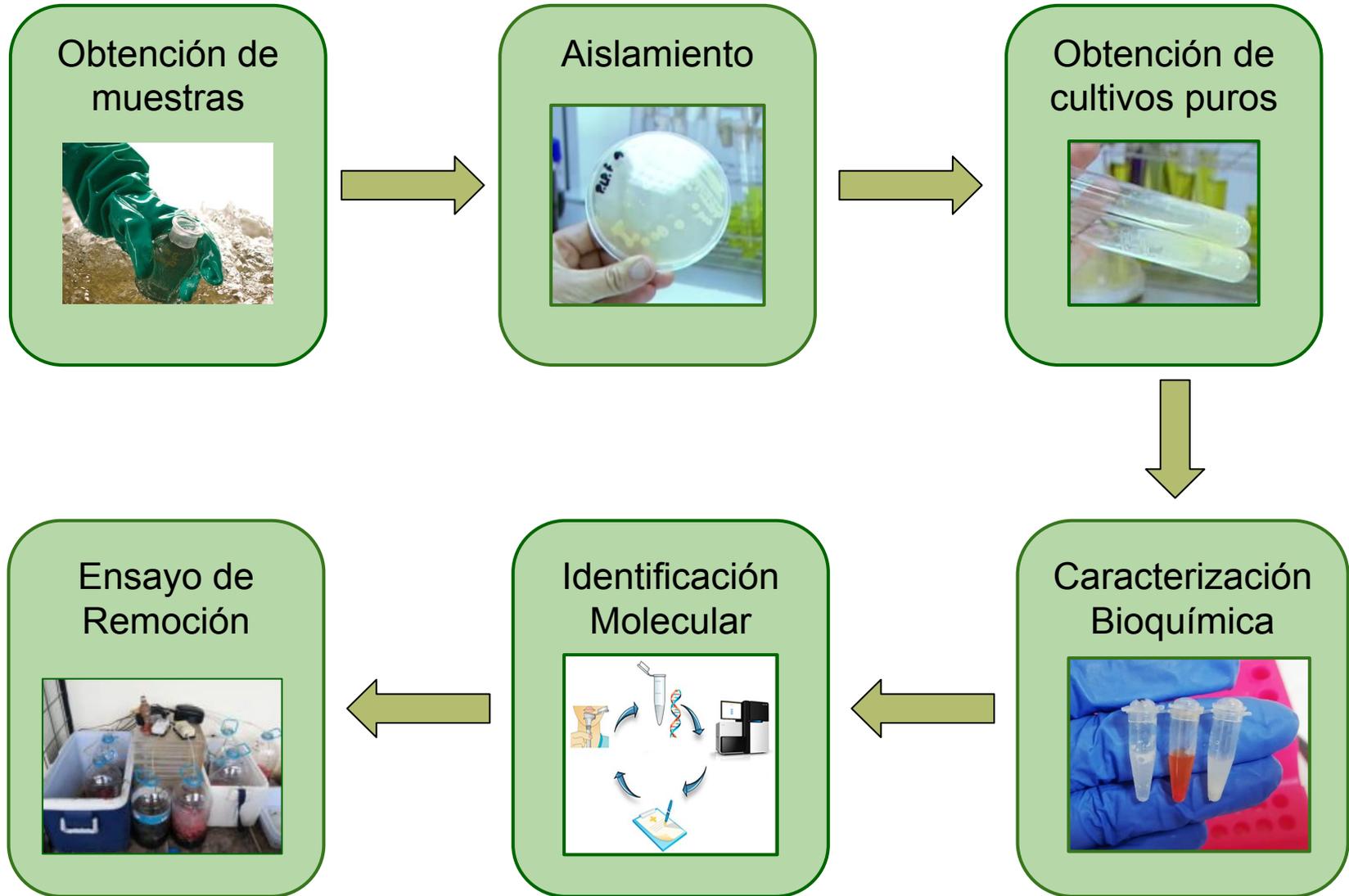


HIPÓTESIS

Existe al menos un microorganismo facultativo degradador de materia orgánica presente en una planta de tratamiento de agua residual.



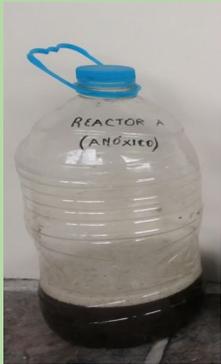
MATERIALES Y MÉTODOS



MATERIALES Y MÉTODOS

Toma de Muestras

Escalamiento a nivel laboratorio de reactores para acondicionamiento de muestras.



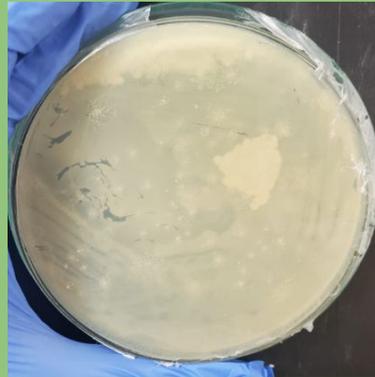
Reactor Anóxico

Reactor Aerobio

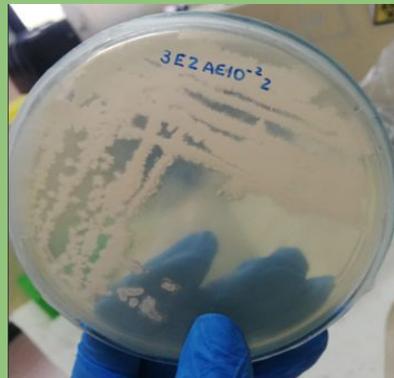


Aislamiento de Microorganismos

1. Siembra por extensión.

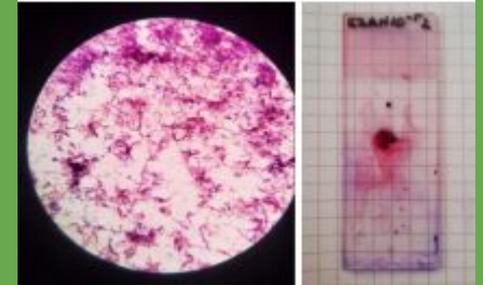


2. Siembra por estrias



Caracterización Bioquímica

1. Tinción: Tinción Gram



1. Pruebas Reactivas



* Catalasa

* Ureasa

* Amilasa

* Oxidasa



MATERIALES Y MÉTODOS

Caracterización Bioquímica

3. Medios Selectivos

Medio Agar MacConkey



Medio Agar Eosina y Azul de Metileno (EMB)



Identificación Molecular

1. Extracción de DNA



2. Cuantificación DNA



3. Secuenciación de Alto Rendimiento



Ensayo de remoción



Cultivos Puros



Caldos para inoculación

Control de parámetros

- * pH
- * OD
- * Turbidez
- * Conductividad
- * TDS



MATERIALES Y MÉTODOS

Montaje de Reactores MBBR

Reactores Lixiviado 1



Reactores Lixiviado 2



Descripción de los ensayos

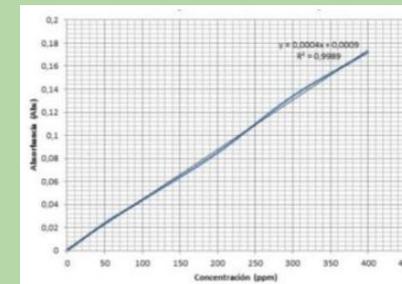
Ensayo	Tratamiento	Composición
Ensayo 1 P 1-2	Reactor A	Agua cruda + sorbetes + aireación
	Reactor B	Agua cruda + sorbetes + tratamiento tradicional + aireación
	Reactor C	Agua cruda + sorbetes + caldos microbianos + aireación
Ensayo 2 P 9	Reactor D	Agua cruda + sorbetes + aireación
	Reactor E	Agua cruda + sorbetes + tratamiento tradicional + aireación
	Reactor F	Agua cruda + sorbetes + caldos microbianos + aireación

Determinación de Remoción de DQO



Determinación de parámetros Ambientales

Lectura de viales de DQO

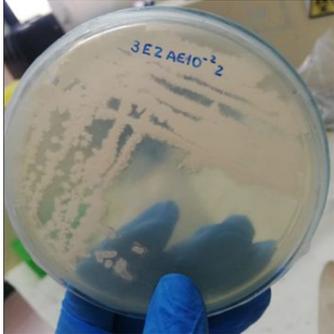


Determinación de disminución de carga orgánica (DQO) mediante curva de calibración

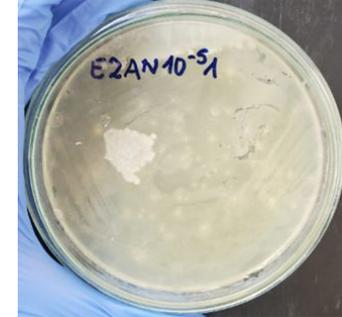
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS DE COLONIAS AISLADAS

COLONIAS AEROBIAS



COLONIAS ANÓXICAS



Color: Blanquecino
Forma: Redonda -Irregular
Tamaño: Pequeño - Mediano
Textura: Cremosas

Características morfológicas de las colonias aerobias aisladas.

Muestra	Código	Color	Forma Macroscópica	Tamaño	Textura
E1AE10-2(1)	01AE	Blanca	Redonda	Pequeña	Cremosa
E2AE10-2(2)	02AE	Blanca	Irregular	Mediana	Cremosa
2E1AE10-1(1)	03AE	Blanca	Redonda	Pequeña	Cremosa
2E1AE10-2(2)	04AE	Blanca	Irregular	Pequeña	Cremosa
2E1AE10-3(1)	05AE	Blanca	Redonda	Pequeña	Cremosa
2E2AE10-1(2)	06AE	Blanca	Irregular	Mediana	Cremosa
3E2AE10-2(2)	07AE	Blanca	Irregular	Mediana	Cremosa

Características morfológicas de las colonias anóxicas aisladas.

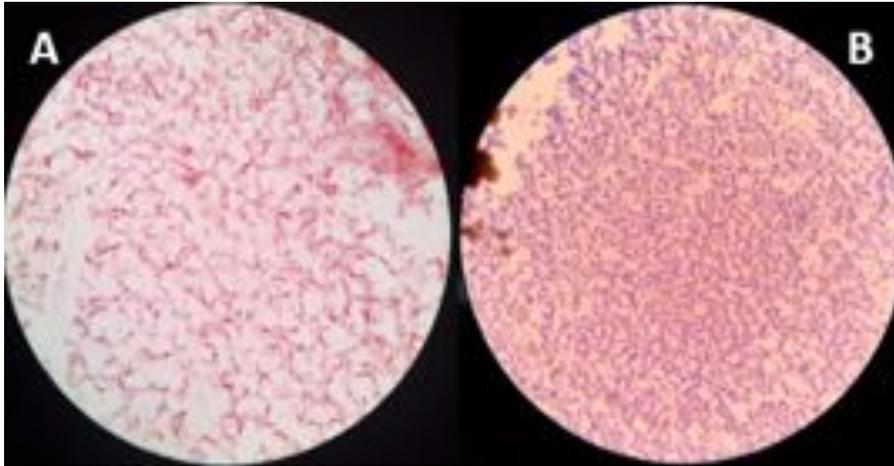
Muestra	Código	Color	Forma Macroscópica	Tamaño	Textura
E1AN10-5(1)	08AN	Blanca	Redonda	Mediana	Cremosa
E1AN10-5(2)	09AN	Blanca	Irregular	Mediana	Cremosa
E1AN10-5(3)	10AN	Blanca	Irregular	Pequeña	Cremosa
E1AE10-5(4)	11AN	Blanca	Redonda	Mediana	Cremosa
E2AN10-5(1)	12AN	Blanca	Irregular	Mediana	Cremosa
E2AN10-5(2)	13AN	Blanca	Redonda	Pequeña	Cremosa
2E2AN10-5(1)	14AN	Blanca	Redonda	Mediana	Cremosa



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

PRUEBAS BIOQUÍMICAS

TINCIÓN GRAM



Formas Identificadas:

Cocos, Bacilos, Cocobacilos

Tipos de Bacterias:

- Gram Negativas - rosadas (A)
- Gram Positivas - moradas (B)

Resumen de resultados morfológicos y colorimétricos de la Tinción Gram

Muestra	Código	Tinción Gram	Forma
AEROBIA	01AE	Gram Positiva	Cocos
	02AE	Gram Negativa	Cocos
	03AE	Gram Positiva	Cocobacilos
	04AE	Gram Negativa	Bacilos
	05AE	Gram Negativa	Cocos
	06AE	Gram Positiva	Bacilos
	07AE	Gram Positiva	Cocobacilos
ANÓXICA	08AN	Gram Positiva	Cocos
	09AN	Gram Negativa	Bacilos
	10AN	Gram Positiva	Bacilos y Cocobacilos
	11AN	Gram Negativa	Bacilos
	12AN	Gram Negativa	Bacilos
	13AN	Gram Negativa	Bacilos
	14AN	Gram Negativa	Bacilos



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

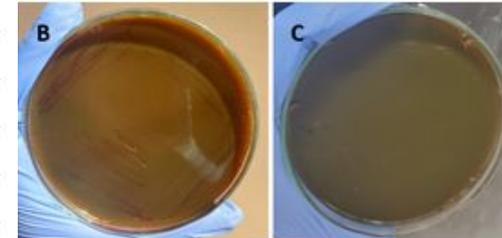
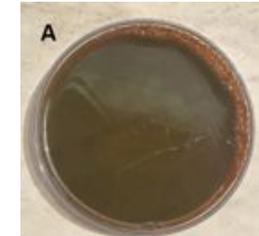
PRUEBAS BIOQUÍMICAS

MEDIOS SELECTIVOS

Agar MacConkey



Agar EMB



Resumen de resultados de los agares selectivos aplicados a las colonias aerobias y anóxicas.

Muestra	Código	Agar MacConkey		Agar EMB	
		Crecimiento	Coloración	Crecimiento	Coloración
AEROBIA	01AE	-	SC	-	SC
	02AE	+	Rosada	+	Morado
	03AE	+	Rosada	-	SC
	04AE	-	SC	+	Morado
	05AE	+	Blanquecino	+	Incolora
	06AE	+	Rosada	+	Morado
	07AE	-	SC	-	SC
	08AN	-	SC	+	SC
ANÓXICA	09AN	-	SC	-	SC
	10AN	-	SC	+	Morado
	11AN	+	Rosada	-	SC
	12AN	+	Rosada	+	Morado
	13AN	+	Rosada	+	Morado
	14AN	+	Rosada	+	Morado

Crecimiento:

Existe crecimiento: +

Ausencia crecimiento: -

Color colonias:

Rosadas y Blanquecinas

Crecimiento:

Existe crecimiento: +

Ausencia crecimiento: -

Color colonias:

Moradas e Incoloras

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

PRUEBAS BIOQUÍMICAS

PRUEBAS REACTIVAS

Resumen de resultados de las cuatro pruebas reactivas aplicadas a las colonias aerobias y anóxicas.

Muestra	Código	Ureasa	Catalasa	Amilasa	Oxidasa
AEROBIA	01AE	+	+	+	-
	02AE	-	-	-	-
	03AE	-	+	+	+
	04AE	-	-	-	-
	05AE	-	+	+	+
	06AE	+	+	+	-
	07AE	-	+	+	-
ANÓXICA	08AN	-	-	-	+
	09AN	-	+	-	-
	10AN	-	+	-	+
	11AN	+	+	+	-
	12AN	+	+	-	-
	13AN	+	-	-	+
	14AN	+	+	-	-

CATALASA

+ Burbujeo
- Sin reacción



AMILASA

+ Transparente
- Marrón



UREASA

+ Rojo
- Anaranjado



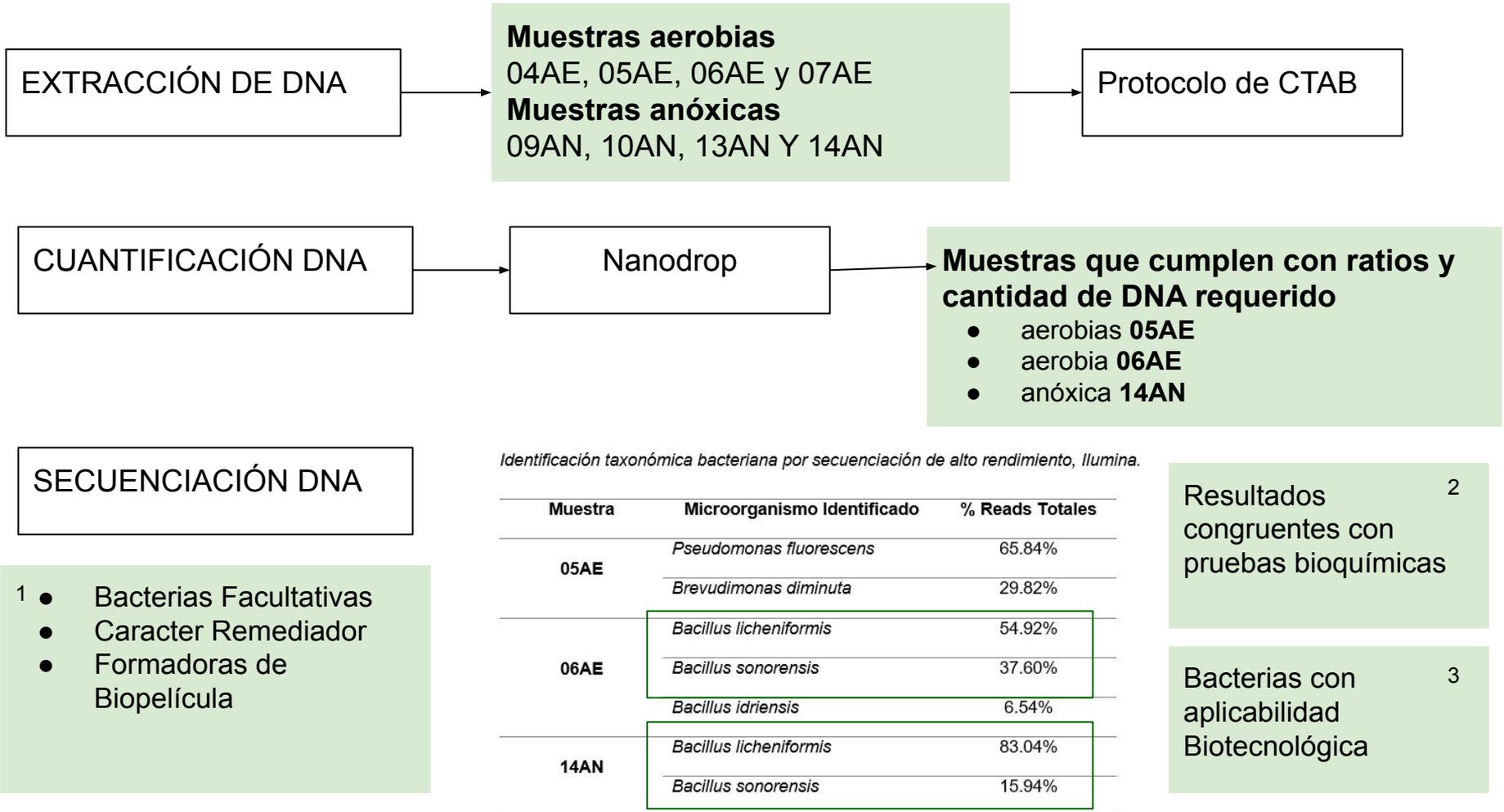
OXIDASA

- Blanquecino
+ Morado intenso



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CARACTERÍSTICAS GENOTÍPICAS DE COLONIAS AISLADAS

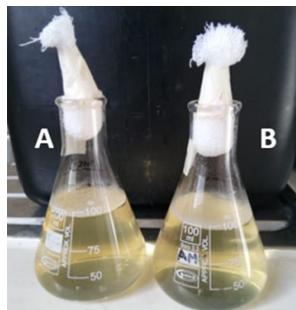


RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ENSAYOS DE REMOCIÓN DE MATERIA ORGÁNICA

Caldo de Multiplicación

- Aerobio 231 NTU (77 mg/L)
- Anóxico 370 NTU (124 mg/L)

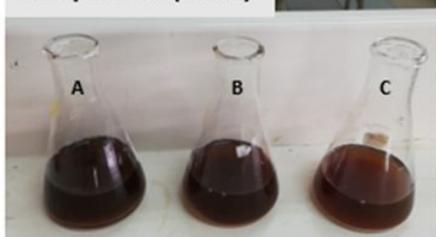


Propiedades organolépticas de los tratamientos de lixiviados.

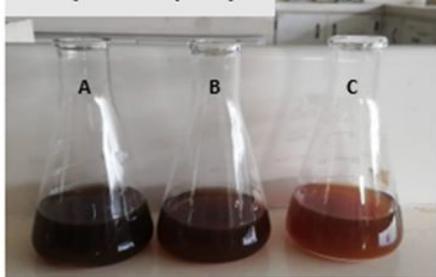
Muestra	Tratamiento	Tiempo (días)	Color	Olor
Lixiviado 1 (P 1-2)	Reactor A	t0	Negro	Desagradable
		t3	Café oscuro	Desagradable
		t5	Café oscuro	Desagradable
	Reactor B	t7	Café	Disminución de olor
		t0	Negro	Desagradable
		t3	Café oscuro	Desagradable
		t5	Café oscuro	Desagradable
Lixiviado 2 (P 9)	Reactor C	t7	Café	Disminución de olor
		t0	Negro	Desagradable
		t3	Café	Desagradable
	Reactor D	t5	Café	Disminución de olor
		t7	Café claro	Disminución de olor
		t0	Negro	Desagradable
		t3	Café oscuro	Desagradable
Lixiviado 2 (P 9)	Reactor E	t5	Café oscuro	Desagradable
		t7	Café	Disminución de olor
		t0	Negro	Desagradable
	Reactor F	t3	Café oscuro	Desagradable
		t5	Café	Disminución de olor
		t7	Café claro	Disminución de olor
		t0	Negro	Desagradable

Muestra Lixiviado 1
(P 1-2)

Tiempo: día 0 (inicial)

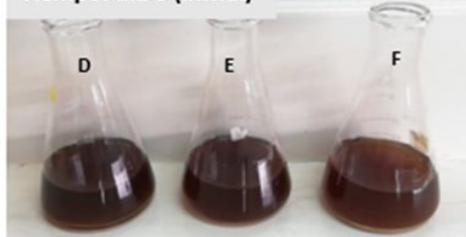


Tiempo: día 7 (final)

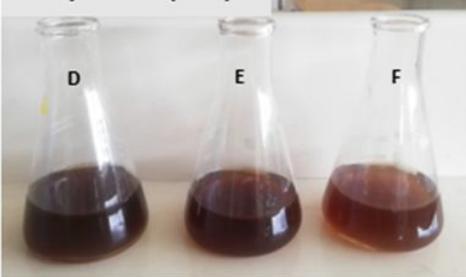


Muestra Lixiviado 2
(P 9)

Tiempo: día 0 (inicial)



Tiempo: día 7 (final)



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

DQO

Muestra	Tratamiento	Tiempo (días)	% Remoción DQO
Lixiviado 1 (P1-2)	Reactor A	0	---
		3	9.55 %
		5	13.48 %
	Reactor B	7	19.65 %
		0	---
		3	7.30 %
	Reactor C	5	11.23 %
		7	20.77 %
		0	---
Lixiviado 2 (P9)	Reactor D	3	2.66 %
		5	4.25 %
		7	6.38 %
	Reactor E	0	---
		3	17.54 %
		5	23.39 %
	Reactor F	7	42.00 %
		0	---
		3	24.46 %
		5	34.02 %
		7	44.66 %

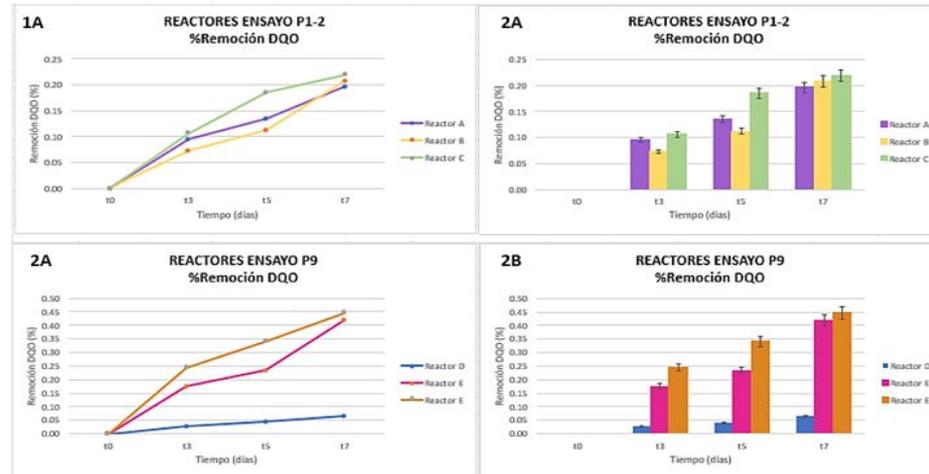
PARÁMETROS AMBIENTALES

2 % Remoción Lixiviado 1: 21.90%
% Remoción Lixiviado 2; 44.66%

1 Reactor Tipo MBBR



Gráficas de tendencia porcentual de remoción de DQO en los diferentes ensayos.



- ### OTROS:
- Conductividad
 - pH
 - OD
 - Turbidez
 - TDS

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ANÁLISIS ESTADÍSTICO: DISMINUCIÓN DE DQO

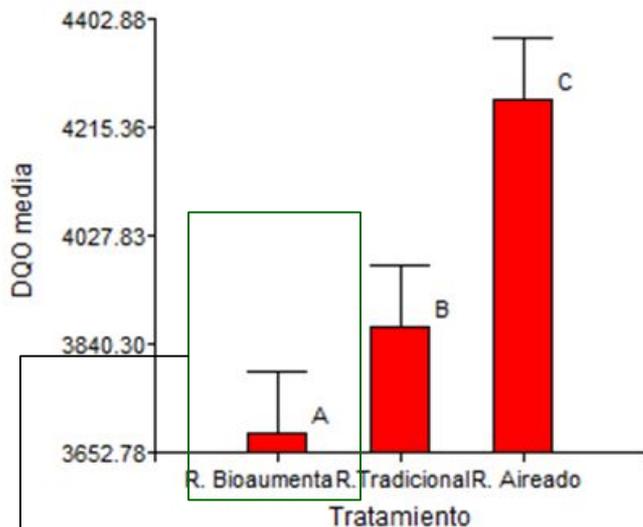
Test de Duncan

Análisis estadístico con Test de Duncan aplicado al tipo de lixiviado.

Lixiviado	Medias	n	E.E.	
Lixiviado 1	3958.75	12	87.29	A
Lixiviado 2	3921.25	12	87.29	A

No existe diferencia significativa entre lixiviados 1 y 2, por ello reactores se toman solo por tratamientos

Media de DQO según el tratamiento aplicado



- R. Tradicional y el R. Bioaumentación, (A) son los mejores tratamientos para remediación
- Mejor tratamiento entre ambos es el R. Bioaumentación con la media menor de DQO de entre los 3 tratamientos

Análisis estadístico con Test de Duncan aplicado al tipo de tratamiento en los reactores.

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
R. Bioaumentación	3686.88	8	106.91	A
R. Tradicional	3871.25	8	106.91	A
R. Aireado	4261.88	8	106.91	B

Menor cantidad de M.O. después de 7 días de tratamiento



CONCLUSIONES

- Dentro de una PTAR existen tratamientos biológicos aerobios, anaerobios y anóxicos, los mismos que gracias a su funcionalidad y aplicación adecuada ayudan a disminuir las cargas orgánicas contaminantes presentes en las aguas residuales.
- Los lixiviados iniciales no fueron sometidos a ningún tratamiento previo, por ello se escaló a nivel de laboratorio biorreactores para ambientar las muestras aerobia y anóxica para el posterior aislamiento de microorganismos nativos del lixiviado, esperando encontrar bacterias con propiedades facultativas.
- La aplicación de pruebas bioquímicas (tinción, pruebas reactivas y medios selectivos) permitieron determinar características fenotípicas de los microorganismos, sin embargo, para una identificación en género y especie, fue necesaria una identificación genotípica, mediante la tecnología Illumina, con esto se pudo determinar la presencia de *Bacillus sonorensis* y *Bacillus licheniformis* en las muestras analizadas, mismas que carácter remediator y son bacterias facultativas.



CONCLUSIONES

- La Bioaumentación es una de las alternativas ambientales más usadas para bioremediación, ya que es eficiente y de bajo costo. Uno de los sistemas de mayor utilidad es el sistema MBBR, que permite una alta subsistencia a los microorganismos mediante la formación de biopelícula, y al ser un proceso aerobio, genera una degradación más eficiente de los compuestos orgánicos contaminantes presentes en las aguas residuales.
- Después de 7 días de ensayo, el tratamiento con sistema MBBR y bioaumentación de microorganismos nativos de las 2 muestras de lixiviados, determinó que la tasa de degradación de DQO para el lixiviado 1 (P1-2) fue del 21.90%, mientras que para el lixiviado 2 (P9) fue del 44.66%. Esta diferencia porcentual puede deberse a que los microorganismos fueron aislados de la muestra directa e inicial del lixiviado 2, y al ser aplicados en el mismo generaron mayor porcentaje de degradación en comparación al lixiviado 1. Sin embargo, se logró una tasa de biodegradación positiva en ambos biorreactores.



RECOMENDACIONES

- ❖ Mantener un tiempo más prolongado de tratamiento en un sistema MBBR para lograr la formación completa de una biopelícula que permita la degradación de los contaminantes orgánicos, para poder llegar al porcentaje de disminución de DQO máximo.
- ❖ Probar la combinación de tratamientos tradicionales con bioaumentación para generar mayor biodegradación en menor tiempo.
- ❖ Analizar todos los parámetros ambientales aplicados a un lixiviado que permitan determinar el nivel de degradación que se genera y la eficiencia total del tratamiento.
- ❖ Realizar aislamientos de microorganismos y ensayos de degradación de diferentes lixiviados para probar que la disminución de DQO sea mayor si las bacterias usadas en la bioaumentación son nativas de cada lixiviado.
- ❖ Realizar muestreos compuestos para genera una base de datos más robusta y obtener un modelo estadístico mucho más preciso



AGRADECIMIENTOS



Empresa HidroAmbiental C.I.A. LTDA
Ing. Rosa Albuja Yáñez Msc.



Laboratorio de Medio Ambiente
Ing. Oliva Atiaga Franco PhD.



Laboratorio de Microbiología Ambiental
Ing. Andrés Izquierdo PhD.



Laboratorio de Microbiología Molecular
Ing. Francisco Flores PhD



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA