



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.

Arias Santos Carmen Lisette

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

Albuja Yáñez, Rosa Fabiola, M.Sc

08 de marzo de 2024



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Análisis Copyleaks



Plagiarism and AI Content Detection Report

ARIAS.L_DOC.COPYLEAKS_UIC_202351....

Scan details

Scan time: February 22th, 2024 at 3:27 UTC

Total Pages: 78

Total Words: 19264

Plagiarism Detection

	Types of plagiarism	Words
1.3%	Identical	0.1% 23
	Minor Changes	0% 0
	Paraphrased	1.2% 223
	Omitted Words	0% 0

AI Content Detection

	Text coverage	Words
0%	AI text	0% 0
	Human text	100% 19264

[Learn more](#)

Albuja Yáñez, Rosa M.Sc

C.C. 1710517978



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de integración curricular: **“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.”** fue realizado por la **señorita Arias Santos Carmen Lisette**, el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizada en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual mi permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Sangolquí, 08 de marzo de 2024

Albuja Yáñez, Rosa M.Sc

C.C. 1710517978



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Responsabilidad de Autoría

Yo, **Arias Santos Carmen Lisette**, con cédula de ciudadanía N.º 050429965-2, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: **“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.”** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 08 de marzo de 2024

Arias Santos Carmen Lisette

C.C. 050429965-2



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Autorización de Publicación

Yo, **Arias Santos Carmen Lisette**, con cédula de ciudadanía N.º 050429965-2, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: “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.”, en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 08 de marzo de 2024

Arias Santos Carmen Lisette

C.C. 050429965-2

Dedicatoria

A Dios, por permitirme culminar una etapa más en mi vida, por ser mi fortaleza y por darme la sabiduría necesaria día a día para llegar a donde me lo he propuesto, y mostrarme que su tiempo es perfecto.

A mis padres y mi hermana, por todo su amor, paciencia, confianza y por ser el pilar fundamental en todo el trayecto de mi vida estudiantil y personal, por mantenerse a mi lado a pesar de mis resbalones y ser quienes me han levantado y alentado a seguir adelante.

A mis bisabuelos, por ser un ejemplo de lucha y perseverancia, por siempre confiar en mí, por todas sus enseñanzas y por estar presentes en cada momento importante de mi vida.

A mis compañeras de proyecto, Emily y Paola, por ser perseverantes, dedicadas y constantes para lograr sacar adelante este proyecto. Por todas las risas, anécdotas y conocimiento que compartimos en los laboratorios juntas.

A mis familiares, pareja, amigos, conocidos y todas las personas que han pasado por mi vida a lo largo de todos estos años, por ayudarme a crecer académica y personalmente, por ser un apoyo en los mejores y peores momentos, por su cariño, compañía y cada una de las experiencias y anécdotas que hemos construido juntos.

A mi directora de tesis, por ser más que una docente una amiga incondicional, por creer en mí, en mis conocimientos y por su apoyo en mi vida académica, personal y laboral.

Agradecimiento

Quiero extender mis más sinceros agradecimientos a todas aquellas personas que han formado parte de este gran logro y, que de una u otra manera han aportado para que este sea posible. Espero no pasar por alto a ninguno de ellos...

Primeramente, a Dios por darme salud y vida para haber podido llegar a culminar esta etapa estudiantil, por ser quien a través de mis padres me guio por el buen camino, me lleno de sabiduría y me permitió estar aquí el día de hoy. Por enseñarme que sus tiempos son perfectos y que con paciencia y perseverancia uno puede lograr todo lo que se propone.

A mis padres, Carmen y Enrique, por su apoyo incondicional, porque a pesar de la distancia han sabido cuidarme, aconsejarme y velar por mis intereses personales y académicos. Por ser quienes me inspiran día con día para seguir superándome y creciendo, no solo como profesional, sino como una buena persona. Por darme todo lo necesario y hacer que nunca me falte nada, por su amor, comprensión y paciencia, por hacerme la mujer que soy hoy en día.

A mi hermana, Katherine, por ser mi compañera de risas, llantos y quejas, por ser mi cómplice toda mi vida, por su cariño, su comprensión y por ser un pilar fundamental en todas mis etapas y facetas. Por nunca faltarme, en los buenos y malos momentos y estar siempre conmigo.

A mis bisabuelitos, Antonio y Luisa, por ser como mis segundos padres, por cuidarme y quererme incondicionalmente, por alimentarme día a día con sus enseñanzas y siempre guiarme por el mejor de los caminos. Por entender y esperarme cada fin de semana, el poquito tiempo que podía compartir con ellos para lograr llegar a la meta. Por siempre recibirme con la mejor de las sonrisas y motivarme a seguir adelante.

A mi tía, Betty, por acogerme con cariño y brindarme todas las comodidades en su hogar todo el periodo que viví con ella, por escucharme y preocuparse por mí todos los días. Por ser mi

compañía cuando apenas empecé a aventurarme en este reto que hoy en día es una meta más cumplida.

A mi mejor amiga de toda la vida, Gabriela Culqui, por ser más que mi amiga mi hermana, porque después de tantos años, distancias y obstáculos, nunca me ha dejado sola en los buenos y malos momentos. Por su cariño incondicional, por su apoyo, por su lealtad, por todas y cada una de las anécdotas que hemos vivido y construido juntas, y por todas aquellas que aún nos faltan por vivir.

A mis mejores amigos de la Universidad, Emily, Cristian y Jesús, por ser mi apoyo incondicional, por compartir no solo las aulas conmigo, sino también una parte de sus vidas. Por todos los consejos, las risas, los llantos, los abrazos, las desveladas y el cariño que hemos compartido a lo largo de este tiempo. Por ser personas únicas, inigualables e irremplazables. Por estar presentes en los mejores y peores momentos, por creer en mí, por siempre darme aliento para seguir de pie y por nuestras convivencias diarias que espero nunca olvidemos.

A mi enamorado, Leonel Vivas, por ser mi compañero de aventuras, por todo su tiempo, su cariño, amor y comprensión, por ser mi apoyo y mi inspiración, por escucharme y alentarme a seguir preparándome día tras día, por caminar de la mano conmigo en todos los buenos y malos momentos, para que esto sea el inicio de algo mucho más grande.

A los amigos y compañeros más cercanos que me regaló la vida universitaria, José, Uwe, Nadin, Karolay, Maxi, Eduardo, Bryan, Majo y Alexis, por todos los buenos momentos que me regalaron dentro y fuera de las aulas, por su cariño, su apoyo, por compartir conmigo su conocimiento cuando fue necesario. Por estar siempre al pendiente de mí, por apoyarme y no dejarme sola cuando lo necesitaba.

A mis compañeras de proyecto, Emily y Paola, por desarrollar este proyecto de la mano, por ser pacientes, colaboradoras y comprensivas conmigo, por trabajar arduamente de principio a fin para lograr nuestro objetivo de ser Ingenieras Biotecnólogas.

A mis compañeros y docentes de los distintos laboratorios, por su predisposición y colaboración a la hora de trabajar en los laboratorios, por apoyarnos mutuamente, por las anécdotas y las risas que compartimos en el tiempo que desarrollamos nuestros proyectos.

A mis docentes universitarios, en especial a la Dra. Oliva Atiaga por su colaboración y apoyo incondicional a lo largo del desarrollo de este proyecto, por facilitarnos el laboratorio de Medio Ambiente y todos los equipos necesarios, además de sus consejos y enseñanzas en las aulas.

Y al Ing. Luis Escobar, que fue uno de mis impulsos y un gran apoyo desde el inicio de mi carrera para poder llegar y culminar con éxito esta etapa.

A mi directora de tesis, la Ing. Rosita Albuja, que con su gran conocimiento supo guiarnos y sacar en alto este proyecto que hoy nos permite ser profesionales. Además, de que, con su cariño, ha sido más que una docente, una amiga que me ha apoyado tanto en mi vida personal, académica y laboral para ayudarme a crecer como persona y como profesional. También, un extenso agradecimiento a HidroAmbiental, por brindarnos todas las facilidades para poder culminar con éxito nuestro proyecto.

A todas las personas que de una u otra manera han cruzado por mi vida, por enseñarme que todas las cosas tienen un principio y un final, por motivarme a crecer y a prepararme todos los días. Por ser una parte muy importante para mí en su momento, por regalarme buenos y grandes recuerdos. Por darme la mano, cuando lo necesite y por ser personas que siempre tendré plasmadas en el corazón.

A todos ustedes...mil y una veces, gracias.

Índice de Contenidos

Análisis Copyleaks	2
Certificación	3
Responsabilidad de Autoría	4
Autorización de Publicación	5
Dedicatoria.....	6
Agradecimiento	7
Abreviaturas.....	20
Resumen	22
Abstract.....	23
Capítulo I: Introducción	24
Planteamiento del problema	24
Justificación del Problema	25
Hipótesis	26
Objetivos.....	27
Objetivo General	27
Objetivos Específicos	27
Capítulo II: Marco Teórico	28
Aguas Residuales	28
Caracterización de las Aguas Residuales.....	28
Muestreo de Aguas Residuales	29

	11
Tipo de Muestreo	29
Tipos de Aguas Residuales	30
Aguas residuales domésticas.....	30
Aguas residuales industriales.....	30
Aguas residuales agrícolas	31
Aguas residuales municipales.....	31
Lixiviados	31
Características de las Aguas Residuales (Lixiviados).....	32
Características Físicas.....	32
Características Químicas	33
Características Biológicas.....	34
Caracterización Microbiológica de un lixiviado.....	35
Tratamiento de Aguas Residuales.....	35
Métodos Físico-Químicos	35
Métodos Biológico.....	36
Tipos de Microorganismos presentes en lixiviados	38
Microorganismos Aerobios.....	38
Microorganismos Anaerobios.....	38
Microorganismos Facultativos.....	38
Normativa Ambiental	39
Caracterización Fenotípica Microbiana.....	40

	12
Características Microscópicas.....	40
Características Macroscópicas	42
Pruebas Bioquímicas	46
Pruebas de Identificación Molecular Bacteriana	47
Extracción de DNA cromosómico.....	48
Amplificación de DNA	48
Secuenciación de DNA	48
Capítulo III: Metodología.....	51
Ubicación geográfica.....	51
Descripción de la Empresa.....	51
Toma de muestras y escalamiento	52
Plan de muestreo	52
Tratamiento muestra cruda.....	53
Medición de parámetros	53
Determinación de DQO.....	53
Determinación de pH	54
Determinación de conductividad eléctrica	54
Determinación de TDS.....	54
Determinación de OD.....	55
Aislamiento de microorganismos	55
Esterilización.....	55

	13
Medios de cultivo	55
Diluciones	56
Siembra por extensión	56
Siembra por estrías.....	57
Cultivos Puros.....	58
Caracterización e Identificación Microbiana.....	58
Pruebas Bioquímicas	58
Medios Selectivos.....	60
Identificación Molecular.....	61
Ensayos de Biorremediación de Lixiviados.....	64
Caldos Bacterianos.....	64
Montaje de Biorreactores	65
Bioaugmentación	66
Monitoreos	66
Medición de Parámetros Ambientales	67
Demanda Química de Oxígeno (DQO)	67
Potencial Hidrógeno (pH).....	67
Oxígeno Disuelto (OD).....	67
Turbidez.....	68
Conductividad Eléctrica.....	68
Sólidos Disueltos Totales (TDS)	68

	14
Diseño Experimental	68
Hipótesis	70
Variable de respuesta	70
Factores:	70
Capítulo IV: Resultados	71
Acondicionamiento y toma de muestras	71
Aislamiento de microorganismos	71
Caracterización Bioquímica e Identificación Molecular	75
Análisis Bioquímico	75
Tinciones	75
Pruebas Reactivas	77
Medios Selectivos	82
Análisis Molecular	84
Ensayos de Biorremediación de Lixiviados	87
Caldos Bacterianos	87
Muestreos	87
Monitoreos y Parámetros de Control	89
Propiedades Organolépticas	89
Parámetros Ambientales	91
Análisis Estadístico	98
Capítulo V: Discusión	106

Capítulo VI: Conclusiones	110
Capítulo VII: Recomendaciones	112
Referencias Bibliográficas.....	113

Índice de Tablas

Tabla 1. <i>Límites máximos permisibles en lixiviados.</i>	39
Tabla 2. <i>Formulación de Agar Nutritivo.</i>	44
Tabla 3. <i>Formulación de Medio Agar MacConkey</i>	45
Tabla 4. <i>Formulación del Medio Agar Eosina Azul de Metileno (EMB)</i>	46
Tabla 5. <i>Plan de muestreo.</i>	52
Tabla 6. <i>Descripción de los ensayos y tratamientos de los lixiviados.</i>	69
Tabla 7. <i>Diseño experimental</i>	69
Tabla 8. <i>Parámetros ambientales iniciales de las muestras crudas.</i>	71
Tabla 9. <i>Características morfológicas de las colonias aerobias aisladas.</i>	72
Tabla 10. <i>Características morfológicas de las colonias aerobias aisladas.</i>	73
Tabla 11. <i>Resumen de resultados morfológicos y colorimétricos de la Tinción Gram.</i>	76
Tabla 12. <i>Resumen de resultados de las cuatro pruebas reactivas aplicadas a las colonias aerobias y anóxicas.</i>	81
Tabla 13. <i>Resumen de resultados de las cuatro pruebas reactivas aplicadas a las colonias aerobias y anóxicas.</i>	83
Tabla 14. <i>Resultados de cuantificación de DNA bacteriana.</i>	85
Tabla 15. <i>Identificación taxonómica bacteriana por secuenciación de alto rendimiento, Illumina.</i>	86
Tabla 16. <i>Propiedades organolépticas de los tratamientos de lixiviados.</i>	89
Tabla 17. <i>Parámetros ambientales medidos en los distintos reactores en el tiempo.</i>	92
Tabla 18. <i>Valores de DQO (mg/L) medidos en el tiempo de los distintos tratamientos.</i>	94

Tabla 19. <i>Porcentajes de disminución de DQO en los diferentes tratamientos.</i>	96
Tabla 20. <i>Datos experimentales de disminución de DQO</i>	98
Tabla 21. <i>Promedio de DQO por tipo de tratamiento aplicado en cada lixiviado.</i>	100
Tabla 22. <i>Análisis estadístico con Test de Duncan aplicado al tipo de lixiviado.</i>	102
Tabla 23. <i>Análisis estadístico con Test de Duncan aplicado al tiempo de tratamiento.</i>	103
Tabla 24. <i>Análisis estadístico con Test de Duncan aplicado al tipo de tratamiento en los reactores.</i>	103
Tabla 25. <i>Análisis estadístico con Test de Duncan aplicado a la relación entre el tipo de lixiviado y el tratamiento aplicado.</i>	104

Índice de Figuras

Figura 1. <i>Ubicación geográfica de la empresa HIDROAMBIENTAL CIA Ltda.....</i>	51
Figura 2. <i>Ubicación geográfica de la empresa BIOSEQUENCE S.A.S.....</i>	64
Figura 3. <i>Colonias aisladas con microorganismos aerobios.</i>	73
Figura 4. <i>Colonias aisladas con microorganismos anóxicas.....</i>	74
Figura 5. <i>Microorganismos aerobios y anóxicos en cultivos puros.</i>	75
Figura 6. <i>Muestra con bacterias Gram negativas y con bacterias Gram positivas.</i>	76
Figura 7. <i>Prueba de reactividad de ureasa.....</i>	78
Figura 8. <i>Prueba reactiva de catalasa</i>	78
Figura 9. <i>Prueba reactiva de amilasa</i>	79
Figura 10. <i>Prueba reactiva de oxidasa.</i>	80
Figura 10. <i>Crecimiento en el medio selectivo y diferencial Agar MacConkey</i>	82
Figura 11. <i>Crecimiento en el medio Agar Eosina y Azul de Metileno (EMB).....</i>	83
Figura 12. <i>Caldos bacterianos para bioaumentación.....</i>	87
Figura 13. <i>Reactores escalados a laboratorio.</i>	88
Figura 14. <i>Reactores escalados a nivel de laboratorio con fuente de aireación.....</i>	88
Figura 15. <i>Frascos de muestras tomadas de los reactores.</i>	89
Figura 16. <i>Variación de color en los distintos tratamientos de lixiviados.....</i>	91
Figura 17. <i>Gráficas de tendencia de disminución de valor de DQO en los diferentes ensayos.....</i>	95
Figura 18. <i>Gráficas de tendencia porcentual de remoción de DQO en los diferentes ensayos.....</i>	97
Figura 19. <i>Gráficas de interacción de Disminución de DQO en función del tiempo según el tipo de tratamiento.....</i>	99

Figura 20. <i>Gráfica de interacción DQO promedio y tipo de tratamiento.</i>	101
Figura 21. <i>Gráfica de interacción DQO promedio y tipo de tratamiento.</i>	101
Figura 22. <i>Gráfico de barras de tratamientos de lixiviados y disminución de DQO.</i>	105

Abreviaturas

AE: Aerobio

AN: Anóxico

ANOVA: Análisis de la Varianza

ARN: Ácido Ribonucleico

CTAB: Bromuro de hexadeciltrimetilamonio

DBO: Demanda Bioquímica de Oxígeno

DECA: Diseño experimental completamente aleatorio

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

DQO: Demanda Química de Oxígeno

EMB: Agar eosina azul de metileno

g: Gramos

gl: grados de libertad

L: Litros

MBBR: Reactor de biopelícula de lecho móvil

mg: Miligramos

mL: Mililitros

mS: Mili siemens

nm: Nanómetros

NTU: Unidad nefelométrica de turbidez

OD: Oxígeno disuelto

pb: pares de bases

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

pH: Potencial Hidrógeno

PTAR: Planta de Tratamiento de Aguas Residuales

RNAsa: Ribonucleasa

TDS: Sólidos Disueltos Totales

μL: Microlitros

Resumen

Los lixiviados provenientes de rellenos sanitarios son un problema latente a nivel mundial. En el Ecuador, cada día aumenta la producción y acumulación de basura, saturando los rellenos sanitarios y generando lixiviados indiscriminadamente, mismos que en su mayoría no son tratados por su alto contenido de contaminantes. El presente trabajo aborda esta problemática para generar una alternativa viable y biotecnológica mediante el uso de biorreactores y bioaumentación para disminuir la carga orgánica presente en este tipo de agua residual. Para ello, los microorganismos nativos del lixiviado fueron aislados, y caracterizados de manera bioquímica mediante pruebas reactivas, tinción y medios selectivos logrando una identificación parcial fenotípica. No obstante, mediante pruebas genotípicas por la tecnología Illumina, se logró determinar la presencia de 2 especies bacterianas: *Bacillus sonorensis* y *Bacillus licheniformis*, mismas que son facultativas y con características degradadoras de materia orgánica. Para probar su eficiencia en el tratamiento de los lixiviados, se montaron reactores de modelo MBBR, mismos que fueron sometidos a 3 tratamientos diferentes con 2 tipos de lixiviados de distintas piscinas: Solamente Aireación, Tratamiento Tradicional (Químico) y Bioaumentación. Durante 7 días se realizaron controles y monitoreos de parámetros ambientales como pH, conductividad, TDS, turbidez, OD y DQO, siendo este último el que determinó la eficiencia de los tratamientos. El uso del reactor MBBR juntamente con la bioaumentación, generó la mayor eficiencia de remoción de DQO, dando como resultado una disminución del 21.90% para el lixiviado 1 y un 44.66% para el lixiviado 2. De manera estadística se sustentó que los resultados obtenidos en la experimentación son correctos y el mejor tratamiento para remediar lixiviados es el uso de microorganismos nativos juntamente con el sistema MBBR.

Palabras Clave: lixiviado, bioaumentación, reactores, remoción de DQO, sistema MBBR.

Abstract

Leachate from landfills is a latent problem worldwide. In Ecuador, the production and accumulation of garbage increases every day, saturating landfills and generating leachate indiscriminately, most of which are not treated due to their high content of contaminants. The present work addresses this problem to generate a viable and biotechnological alternative using bioreactors and bioaugmentation to reduce the organic load present in this type of wastewater. To this end, the native microorganisms from the leachate were isolated and characterized biochemically using reactive tests, staining and selective media, achieving a partial phenotypic identification. However, through genotypic tests using Illumina technology, it was possible to determine the presence of 2 bacterial species: *Bacillus sonorensis* and *Bacillus licheniformis*, which are facultative and have organic matter-degrading characteristics. To test their efficiency in leachate treatment, MBBR model reactors were set up, which were subjected to 3 different treatments with 2 types of leachates from different pools: Aeration Only, Traditional Treatment (Chemical) and Bioaugmentation. For 7 days, controls and monitoring of environmental parameters such as pH, conductivity, TDS, turbidity, DO and COD were carried out, the latter being the one that quantifies the efficiency of the treatments. The use of the MBBR reactor together with bioaugmentation generated the highest COD removal efficiency, resulting in a decrease of 21.90% for leachate 1 and 44.66% for leachate 2. Statistically, it was supported that the results obtained in the experimentation is correct and the best treatment to remediate leachate is the use of native microorganisms together with the MBBR system.

Key Words: leachate, bioaugmentation, reactors, COD removal, MBBR system.

Capítulo I: Introducción

Planteamiento del problema

El constante y acelerado crecimiento de la población urbana, genera una gran cantidad de desechos sólidos, que a pesar de medidas como el reciclaje que tratan de disminuir su impacto, estos siguen siendo eliminados y desechados diariamente en vertederos y rellenos sanitarios (Orozco, 2018). El 90% de desechos sólidos a nivel mundial no se gestionan de manera correcta, esto quiere decir que, sin gestión, dichos desechos, sean vertidos o quemados, son perjudiciales para la salud humana, el ambiente, el cambio climático, además de ser un problema de desarrollo económico (Banco Mundial, 2018).

Alrededor de todo el mundo, se generan aproximadamente 2010 millones de toneladas de desechos sólidos municipales al año, y el crecimiento poblacional y urbanización, disparará este índice de producción de desechos en un 70% para los siguientes 30 años si no se acogen medidas urgentes con respecto a la gestión y disposición final de los desechos sólidos (Banco Mundial, 2018).

La inapropiada gestión de este tipo de residuos urbanos provenientes de hogares e industrias, representan un riesgo latente y es una de las causas principales que generan fuentes de contaminación tanto de suelos como de cuerpos de agua (Zafra-Mejía, C. & Romero-Torres D.,2019).

La disposición de los residuos sólidos generalmente se realiza en los rellenos sanitarios, los mismos que al acumular y descomponer en si materia de todo tipo, desde orgánica a inorgánica, originan lixiviados, los mismos que se catalogan como efluentes acuosos que se originan por la filtración de agua lluvia y varios procesos de reacciones bioquímicas que suceden durante este ciclo. Dichos lixiviados, poseen una composición bastante compleja, debido a su humedad, misma que sobrepasa la capacidad del terreno donde se ubica el relleno

sanitario, y esto da paso a infiltraciones hacia el suelo y aguas subterráneas, creando así un ciclo interminable de contaminación ambiental debido a su alto contenido de contaminantes (Ocampo, M. *et al.*, 2017).

Los desechos sólidos a nivel nacional son producidos diariamente en cantidades descomunales, es así como 12 613 toneladas de basura ahondan en el país (Cando, 2021). De la misma manera, las aguas residuales producidas en Ecuador son tratadas en un 12%, mientras que el restante 88% son descargadas directamente a ríos o quebradas sin previo tratamiento siendo una fuente inminente de contaminación (Torske, 2019).

En la ciudad de Quito, para el año 2020, aproximadamente 150 000 toneladas de desechos y aguas residuales saturaron al máximo los rellenos sanitarios, siendo esta la causa principal de la contaminación de suelos, ríos y aguas subterráneas aledañas al lugar, promoviendo así la dispersión de enfermedades humanas y causando daños irreversibles para el ambiente (La Hora, 2021).

Justificación del Problema

La implementación de una Planta de Tratamiento de Aguas Residuales busca la reducción o eliminación parcial o total de los contaminantes que se encuentran dispersos en los cuerpos de agua producto de procesos que generan contaminación, esta remoción puede ser de manera física, química o biológica (Gómez, 2010).

La finalidad de realizar un tratamiento a las aguas residuales es degradar la materia orgánica e inorgánica presente en el agua, dependiendo de su origen y sus características para lograr una mayor eficiencia en el proceso, dando como resultado un agua que pueda cumplir con los valores permisibles, ya sea para algún tipo de uso o para ser descargados al cauce directamente sin ser contaminantes, para ello la depuración de las aguas residuales requieren

procesos físicos, químicos, biológicos o una combinación de ellos para lograr su cometido (Spiro, 2004).

Una de las alternativas de remediación de aguas residuales, es la bioaumentación, que es el uso de microorganismos para la eliminación de materia orgánica biodegradable, haciendo que estos sintetizen, degraden y eliminen los desechos que están causando contaminación en el agua. Generalmente, quienes realizan este trabajo son los microorganismos primarios (bacterias aerobias, anaerobias y facultativas) que son capaces de metabolizar este tipo de desechos (Muñoz, 2005).

Las técnicas de remediación biológica, sumadas a la implementación de una PTAR, son una herramienta fundamental para disminuir la presencia de contaminantes en las aguas residuales, ya que el trabajo conjunto de estas garantiza que el agua tratada cumpla con las normativas vigentes, dejando de ser un foco de contaminación ambiental y de proliferación de enfermedades antropogénicas (Metcalf & Eddy, 1996).

Por ello, la presente investigación pretende identificar microorganismos que sean capaces de ser utilizados para la remediación biológica de lixiviados mediante la bioaumentación, teniendo así una alternativa biológica a los tratamientos comerciales para tratar este tipo de aguas residuales.

Hipótesis

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

Objetivos

Objetivo General

- 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.

Capítulo II: Marco Teórico

Aguas Residuales

Las aguas residuales son aquellos líquidos que han sido generados por fuentes y actividades antropomórficas y/o naturales originarias de diferentes efluentes y que son recogidas en conjunto en una red de alcantarillado o son liberadas al cauce natural (Mujeriego, 1990). La composición de estas aguas residuales es clave, pues debido a ello pueden resultar altamente contaminantes para el medio ambiente y para los habitantes aledaños de los lugares de depuración de las aguas. Dentro de los contaminantes que pueden poseer los distintos tipos de aguas residuales según su origen tenemos la presencia de materia en suspensión, compuestos inorgánicos y orgánicos, microorganismos patógenos y no patógenos, entre otros (Dewisme, 1997; Matia, *et al.*, 1999).

Caracterización de las Aguas Residuales

Para caracterizar las aguas residuales, es necesario evaluar algunos parámetros que permitan determinar el grado de contaminación que posee para poder determinar el tipo de tratamiento que pueda ayudar a la remediación de dicha agua, ya que los efluentes finales necesariamente tienen que cumplir con los límites permisibles de descarga de acuerdo con la ley vigente (Ahmadian, *et al.*, 2012).

Así, para los lixiviados es necesario determinar parámetros como cargas orgánicas (DQO y DBO), pH, presencia de fósforo, hierro, nitratos, nitritos y sulfatos, además de sólidos suspendidos totales y sedimentables, aceites y grasas (Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica, 2018).

Muestreo de Aguas Residuales

El muestreo de aguas residuales es un paso fundamental para lograr tener una alícuota significativa de agua que permita realizar todos los análisis físicos, químicos, ambientales y microbiológicos que sean necesarios para su apropiada caracterización y posterior remediación, para ello la Norma Técnica Ecuatoriana INEN 2169 (NTE INEN, 2013), establece una serie de pasos y recomendaciones para un correcto muestreo de aguas residuales, que se describen a continuación:

Los recipientes que se utilicen para hacer muestreo de aguas residuales, pueden ser plásticos o de vidrio siempre y cuando estos puedan mantener las propiedades del agua, sobre todo cuando se va a realizar análisis físicos y químicos. Es necesario evitar la entrada de aire, pues esto puede alterar el color y el pH de la muestra. Los recipientes que llevan muestras para conservación deben ser refrigerados de manera inmediata, y para su cadena de transporte debe utilizarse cajas térmicas asegurando un ambiente fresco y evitando el contacto con la luz, desde el lugar de muestreo hasta el punto de llegada. Los recipientes siempre tienen que ser protegidos, sellados y correctamente etiquetados. La temperatura de conservación oscila entre los 2-5°C en un lugar oscuro para evitar la degradación de componentes del agua residual. Todos los materiales en suspensión o sedimentación se deben retirar por filtración antes de cualquier análisis (INEN, 2013).

Tipo de Muestreo

Una muestra es una pequeña representación del cuerpo total de agua que se está analizando, en determinado tiempo, lugar y circunstancia en las que se realiza su recolección (APHA, AWWA, & WPCF, 1992) y, generalmente, el muestreo de aguas residuales se puede realizar de 2 maneras distintas, éstas se describen a continuación:

Muestreo Puntual

Son aquellas muestras que se realizan de manera individual en un tiempo y sitio determinado, y todos sus análisis se realizan de manera aislada. Este muestreo permite evaluar parámetros como OD, temperatura y presencia de cloro en el instante en que se realiza la extracción, es decir, análisis *in situ*, sin embargo, una muestra puntual tiene una representatividad limitada (Marín, 2005).

Muestreo Compuesto

Una muestra completa representa la combinación de varias muestras simples tomadas a diferentes tiempos en el mismo sitio. Este tipo de muestreo es utilizado para evaluar concentraciones promedio de cargas orgánicas e incluso para medir la eficiencia de la PTAR. También representa un ahorro en tiempo y costos, pues se requiere menor cantidad de muestras a analizar en el laboratorio (APHA, AWWA, & WPCF, 1992).

Tipos de Aguas Residuales

Aguas residuales domésticas

Como menciona su nombre, son de origen doméstico, por ello su composición es muy diversa, ya que provienen de las actividades diarias que se realizan en el hogar. Generalmente se componen de desechos biológicos, sobras alimenticias, detergentes y otras sustancias utilizadas dentro de un hogar convencional (Mujeriego, 1990; Madigan, *et al.*, 2009; Milan, 2003).

Aguas residuales industriales

Son aquellas aguas que provienen de vertientes industriales (Metcalf & Eddy, 1996); en donde se han realizado procesos de transformación de materia y para ello se ha utilizado agua. Muchas de las veces, estas aguas vienen acompañadas de aditivos químicos, una alteración

de temperatura o simplemente son liberadas directamente de los procesos productivos (Raymond, 2002).

Aguas residuales agrícolas

Describe a aquellas aguas que provienen del arrastre de aguas de riego y aguas de lluvia, mismas que contienen productos utilizados en la agricultura. Los componentes habituales que se pueden encontrar en la composición de estas aguas generalmente son abonos orgánicos e inorgánicos, pesticidas como insecticidas, plaguicidas, herbicidas, fungicidas, entre otros. Estos componentes pueden afectar no solo a los cuerpos de agua superficial, sino que a través de la infiltración pueden llegar a acuíferos y fuentes de agua subterránea, lo que representa una amenaza silenciosa (Metcalf & Eddy, 1996).

Aguas residuales municipales

Este tipo de aguas, son aquellas que reúnen el conjunto de aguas residuales domésticas, industriales, agrícolas y aquellas que provienen de los asentamientos humanos y de sus actividades. La carga de contaminación que poseen las aguas residuales municipales depende de la cantidad poblacional, además del tipo de actividades y la función del sistema urbano (WWAP, 2017, Milan, 2003).

Lixiviados

Se puede definir a un lixiviado como el líquido resultante de la descomposición de los residuos acumulados en un relleno sanitario, además de ser parte de la percolación de aguas de fuentes externas que atraviesan los residuos cuando están en procesos de degradación (Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica, 2018). La composición de este líquido depende de la edad que tiene el relleno sanitario, además del tipo de residuos del que se encuentra conformado (Glynn H. & Heinke G, 1999).

Los lixiviados pueden representar un riesgo latente si no son tratados adecuadamente, pues al filtrarse el agua con residuos sólidos en estado de descomposición, se filtra no solo materia orgánica que puede ser degradada, sino también muchos tipos de residuos químicos y metales pesados que pueden ser dañinos para las poblaciones aledañas y el medio ambiente, ya que la presencia de sustancias tóxicas y materia orgánica simultáneamente, generan malos olores intensos y pH elevados, lo cual dificulta su tratamiento (Giraldo E., 2001).

Características de las Aguas Residuales (Lixiviados)

La caracterización de un lixiviado puede realizarse mediante pruebas tanto físicas que son aquellas que se basan en sus características superficiales, como por pruebas químicas, las cuales determinan reacciones y metabolismos presentes en las aguas residuales (Seoanez, M., 2003).

Los parámetros físico-químicos y biológicos más importantes que se deben tomar en cuenta en el análisis de un lixiviado se detallan a continuación, sabiendo que son de gran importancia, pues estos nos permiten conocer las alteraciones que se generan en el lixiviado y nos ayudan a buscar una forma adecuada para su remediación.

Características Físicas

Olor

Los olores fuertes y desagradables son muy característicos de los lixiviados, puesto que estos se generan por la presencia de materia orgánica, sus procesos de descomposición y por la existencia de materia volátil (Seoanez, M., 2003). Los efectos de los olores son la principal causa del rechazo a la instalación de PTAR y/o rellenos sanitarios, ya que genera malestar a los habitantes de zonas aledañas, además de producir enfermedades (Manahan, 2007).

Color

La presencia de productos y desechos que se arrojan a las aguas alteran su coloración natural, generando así problemas serios para la vida acuática presente en las diferentes fuentes de agua. Este parámetro se puede clasificar como color aparente, siendo el primero a la vista y determinado por la materia suspendida y presente en el agua, mientras que el color verdadero, es aquel que conserva el agua después de retirar el material en suspensión, es decir al remover su turbidez (Seoanez, M., 2003).

Temperatura

Este parámetro se relaciona directamente con el pH y la conductividad eléctrica que posee el agua, pues la temperatura influye ya sea de manera positiva o negativa, en la disociación y la solubilidad de las sales que se encuentran presentes en las aguas (Seoanez, M., 2003).

Turbidez

La cantidad de materia suspendida que se encuentra en el agua es la que determina este parámetro, mientras mayor sea la cantidad de materiales presentes, el agua se tornará más turbia (Seoanez, M., 2003). Generalmente, la turbidez se determina por el método de nefelometría, que consiste en hacer incidir la muestra de agua con un rayo de luz, y nos muestra su medida en NTU o unidades de Jackson (Báez, 2008).

Características Químicas

Materiales en Suspensión

Son partículas, generalmente sólidas que se encuentran presentes en todo tipo de aguas residuales, ya sean de origen natural o antropológico, estos en gran cantidad pueden generar obstrucciones y lentitud al degradar la materia, pues su determinación se realiza con técnicas de centrifugación o filtración para mejores resultados (Seoáñez, M., 2003).

Potencial Hidrógeno (pH)

Este parámetro permite la cuantificación de los iones hidrógenos que están presentes en el agua. Cuando existen variaciones en la concentración de pH, puede verse afectada la existencia de vida en el medio acuático, ya que esto lo afecta directamente reduciendo la capacidad de metabolismo de muchos organismos que habitan en las aguas (Seoáñez, M., 2003).

Conductividad Eléctrica

Es un parámetro que se encarga de medir el paso de la electricidad a través de cualquier tipo de agua, se encuentra relacionado directamente con la presencia de sustancias disueltas y a su naturaleza, es decir, al origen de cada una de las sustancias que se encuentran fluyendo en el agua (Seoanez, M., 2003).

Características Biológicas

Demanda Química de Oxígeno (DQO)

Es un parámetro químico que mide la cantidad de oxígeno necesario para poder oxidar tanto la materia orgánica como inorgánica presente generalmente en una muestra líquida. En aguas residuales, es un indicador del grado de contaminación, el mismo que se mide en unidades de mgO_2/L (Seoanez, M., 2003).

Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO)

Se habla de DBO, cuando se mide la cantidad de oxígeno que se consume al degradar la materia química mediante reacciones metabólicas y/o bioquímicas, siempre y cuando estas se den en presencia de oxígeno, es decir, en procesos aerobios (Seoanez, M., 2003).

Oxígeno Disuelto (OD)

Este parámetro permite medir la cantidad de oxígeno presente en el agua residual y si variación al existir microorganismos vivos que respiren y lo consuman. Este puede disminuir

con la elevación de la temperatura, salinidad y con las reacciones químicas que se generen en el interior del agua, y también cuando hay disminución de presión atmosférica (Rodríguez, 2005).

Microorganismos

En las aguas residuales, se pueden encontrar todo tipo de microorganismos, generalmente patógenos (bacterias, virus, hongos, microalgas, protozoarios y helmintos), sin embargo, entre esta variedad de patógenos pueden hallarse microorganismos benéficos para la misma remediación del agua residual (Baird, 2005).

Caracterización Microbiológica de un lixiviado

La caracterización microbiológica de un agua residual, en este caso de un lixiviado, es de suma importancia, en especial en el ámbito ambiental y de salud pública, ya que muchos de los cuerpos de agua donde se descargan estas aguas contaminadas están destinadas para el consumo humano y/o animal, y al entrar en contacto con lixiviados u otro tipo de aguas residuales, pueden afectar a la inocuidad del agua causando enfermedades. Existen un sin número de microorganismos presentes en estos desechos líquidos, los cuales generalmente pueden ser patógenos siendo perjudiciales, pero a la vez pueden existir otros tipos de microorganismos que sea potencialmente beneficiosos para la propia remediación de las aguas si son utilizados y tratados de manera correcta (Scragg, A., 1999).

Tratamiento de Aguas Residuales

Métodos Físico-Químicos

Estos tipos de técnicas utilizan la fuerza física y la adición de sustancias químicas en el agua residual que, en conjunto permitan una mayor remoción de material contaminante. Entre los métodos más utilizados tenemos la coagulación-floculación, la oxidación y la precipitación química (Méndez-Novelo, R. *et al.*, 2004).

Métodos Biológico

Es una técnica llamada convencional, en la cual se emplean sistemas vivos para la remediación, es decir, se añaden o proliferan en el mismo ambiente los microorganismos que son capaces de reducir y metabolizar las sustancias tóxicas y contaminantes en un agua residual convirtiéndolas en productos de fácil degradación, no tóxicos y de menor tamaño que el inicial. Este tipo de proceso utiliza técnicas como el lagunaje, reactores de lodos activados, biodiscos, reactores de lecho en suspensión, reactores MBBR, entre otros, mismos que pueden realizarse dentro de procesos con presencia o ausencia de Oxígeno, diferenciándose por el producto final de remoción (Álvarez, A. & Suárez, J., 2006).

Tipos de Tratamientos Biológicos

El tratamiento biológico para aguas residuales es una de las tecnologías más utilizadas para la remoción de contaminantes orgánicos mediante la aplicación de microorganismos vivos para optimizar el proceso natural de eliminación y descomposición de los residuos que contiene el agua (BossTech, 2019). Generalmente, se clasifican en tres tipos de procesos:

Proceso Aerobio

En el proceso aerobio, los microorganismos utilizan y requieren una fuente de oxígeno para poder desintegrar la materia orgánica presente en el agua residual, por ello y para asegurar la presencia de O₂, muchas de las veces, en estos procesos se hace uso de aireadores y difusores de aire (BossTech, 2019).

En el caso de los lixiviados, el tratamiento biológico aerobio resulta muy ventajoso y exitoso, ya que tiene una elevada remoción de hasta el 90% de contaminantes, tanto de DBO como de DQO. Los sistemas más utilizados dentro de estos procesos son mediante lodos activados y la aplicación de un sistema de película fija (Henry, J. & Heike, G., 1999).

Reactor MBBR

Es un proceso biológico que permite una eficiencia alta en la remoción de contaminantes de las aguas residuales, pues a través de este tipo de reactor se puede combinar tecnologías de lodos activados y biopelícula (BossTech, 2021).

La tecnología MBBR, consta de un reactor o tanque de aireación con una apertura superior, lo que lo hace un proceso aerobio al exponer al aire libre al agua residual. Dependiendo del tamaño de interés del reactor, este se llena con un 50 a 70% de volumen del tanque con pequeños chips plásticos en forma de ruedas, que con ayuda de rejillas de ventilación hacen que se mezclen por todo el fluido y entren en contacto con los residuos presentes en el agua, lo cual ayuda a que en el área superficial se genere una biopelícula (BossTech, 2021).

Proceso Anaerobio

En el proceso anaerobio, los microorganismos que habitan aquí no necesitan oxígeno para poder realizar la degradación de materia orgánica y otros componentes, sin embargo, cuando las bacterias descomponen los residuos en el agua, estos producen metano, biomasa y CO₂ (BossTech, 2019).

Proceso Anóxico

Se denomina un proceso anóxico, o desnitrificación al proceso en el cual los microorganismos que habitan utilizan otro tipo de moléculas (sulfato, nitrato, nitrito, selenato) exceptuando totalmente el O₂ para realizar el metabolismo y degradación de materia orgánica, dando como producto de ello eliminación de nitrógeno molecular, azufre y selenio (BossTech, 2019).

Tipos de Microorganismos presentes en lixiviados

Los tratamientos biológicos tienen como base la bioaumentación, es decir, la introducción de microorganismos que sean capaces de metabolizar los residuos presentes en las aguas residuales. Tienen una gran eficiencia además de ser un tratamiento de bajo costo y uno de los más simples para mantener (Bluegold, 2020).

Microorganismos Aerobios

Con este tipo de microorganismos son necesarios procesos con presencia de Oxígeno. Generalmente, se presentan microorganismos como *Pseudomonas*, *Bacillus*, bacterias filamentosas y nitrificantes. Estas bacterias realizan procesos de nitrificación y oxidación. Pueden sobrevivir en condiciones de pH de 5-7 y temperaturas de 9-28°C (Bluegold, 2020).

Microorganismos Anaerobios

Este tipo de microorganismos sobrevive en ambientes sin oxígeno, pero utiliza distintos sustratos para sobrevivir y metabolizar los residuos del agua. Casi siempre, estas son bacterias sintróficas, es decir, que realizan su metabolismo siempre y cuando se encuentren en consorcios, lo que provoca las reacciones químicas de descomposición de la materia. Estas bacterias son de 4 tipos: hidrolíticas, fermentativas-acidogénicas, acetogénicas y metanogénicas (Bluegold, 2020).

Microorganismos Facultativos

Este tipo de bacterias son adaptativas, es decir que pueden realizar sus procesos de metabolismo y degradación de materia orgánica en presencia o ausencia de Oxígeno, pueden cambiar su respuesta metabólica según las condiciones que le ofrece su entorno (aerobio o anaerobio), sin embargo, tienen mucha más preferencia para crecer en ambientes aireados (Bluegold, 2020).

Normativa Ambiental

La Normativa Ambiental vigente en el Ecuador para el control y prevención de contaminación ambiental es el Texto Unificado de Legislación Secundaria de Medio Ambiente, TULSMA (2015), mismo que rige a nivel nacional y es de aplicación obligatoria.

En la Tabla 1, se describen los parámetros para la caracterización ambiental de un lixiviado, además de mostrar su límite permisible para poder ser introducidos en un cuerpo de agua dulce sin ser contaminantes.

Tabla 1.

Límites máximos permisibles en lixiviados.

Parámetro	Siglas	Unidad	Máximo Permissible
Demanda Biológica de Oxígeno	DBO5	mg/L	100
Demanda Química de Oxígeno	DQO	mg/L	200
Potencial Hidrógeno	pH	mg/L	6-9
Fósforo Total	P	mg/L	10
Aceites y Grasas	Sustancias solubles en hexano	mg/L	30
Coliformes Totales	Nmp/100 mL	mg/L	2000
Sólidos Suspendedos Totales	SST	mg/L	100
Sólidos Sedimentables	SS	mg/L	5.0
Sólidos Totales	ST	mg/L	1600

Hierro Total	Fe	mg/L	10.0
Nitratos + Nitritos	(N)	mg/L	10.0
Sulfatos	SO ₄	mg/L	1000

Nota: Normativa de Calidad Ambiental y de Descarga de Efluentes al Recurso Agua. Acuerdo 097-A. Registro Oficial del Ministerio del Ambiente (Tabla 9).

Caracterización Fenotípica Microbiana

La identificación bacteriana generalmente se realiza de manera convencional, es decir, a través de una serie de pruebas reactivas que nos permiten observar sus características fenotípicas, como la morfología, su desarrollo y actividades metabólicas. Los estudios y aplicación de pruebas bioquímicas en bacterias nos permitirán tener muchas características útiles para poder clasificarlas e identificarlas, tanto en género, e incluso llegar a saber hasta su especie. La mayor parte de bacterias pueden identificarse por este método, sin embargo, para aquellas que no se pueden identificar con facilidad, suelen utilizarse métodos genotípicos (Fernández, A., *et al.*, 2010).

Características Microscópicas

El estudio microscópico de los microorganismos permite definir sus características como forma, tamaño y agrupación lo que es un indicio primordial para poder clasificarlas posteriormente. Para lograr estas observaciones al microscopio, es necesario, como primer paso realizar tinciones que permitan la diferenciación de cada una de dichas características (Fernández, A., *et al.*, 2010).

Tinción de Gram

Es una de las tinciones más utilizadas, y en algunos casos la única, ya que este tipo de coloración revela provisionalmente la identificación primaria de una bacteria, proporcionando

características como la uniformidad de la tinción, forma, tamaño, agrupación, disposición y bordes, presencia o ausencia de capsulas y endosporas (Fernández, A., *et al.*, 2010).

Esta técnica de tinción fue desarrollada por Hans Christian Gram, un médico danés, en 1880. La tinción de Gram permite clasificar y diferenciar dos tipos de grupos bacterianos: Gram Positivas, las cuales retienen el colorante primario, azul-violeta (azul de metileno), y las Gram Negativas, mismas que se decoloran fácilmente y retienen el colorante de contraste, rosa (safranina); esto debido a las estructuras que posee cada tipo de bacteria en su pared celular (Rodríguez, P.& Arenas, R., 2018).

La tinción de Gram se fundamenta en la aplicación de cuatro colorantes que interactúen con los microorganismos, y estos se teñirán basándose en las estructuras de su pared celular. Como primer paso, se realiza un frotis regular del microorganismo sobre un portaobjetos, esto tiene que ser fijado con la flama de un mechero para poder colorar los colorantes (Rodríguez y Arenas, 2018). Seguido de ello, se coloca el cristal violeta (colorante primario) por 1 minuto, mismo que se une a la pared celular bacteria, coloreando así todas las bacterias. Se retira el exceso de colorante con agua destilada. Posterior a ello, se añade Lugol por 1 minuto, este colorante trabaja como mordente, es decir impide la salida del cristal violeta de las bacterias que en su estructura poseen peptidoglicano, incluso después de una decoloración, ya que se forma el complejo cristal violeta-Lugol, saturando todos los espacios de la pared bacteriana. Se enjuaga con agua destilada. Seguido, se coloca una mezcla de alcohol-acetona por 30 segundos, misma que funciona como decolorante, la cual deshidrata la pared celular carente de peptidoglicano (Bacterias Gram Negativas), y permite la salida del cristal violeta, situación que no sucede con las bacterias Gram positivas, pues estas poseen gran cantidad de peptidoglicano en su pared celular. Se enjuaga con agua destilada el excedente, y finalmente, se coloca safranina, que es el colorante de contraste o secundario, para teñir las bacterias que no formaron el complejo cristal violeta-Lugol. Se enjuaga con agua destilada, se deja secar y se

observa al microscopio (Delgado, A. *et al.*, 1994; Prescott L. *et al.*, 2004; Koneman E. *et al.*, 2003; González R. *et al.*, 2020).

En la actualidad, la tinción de Gram es una de las más utilizadas, por su versatilidad, eficacia e importancia en los laboratorios, además de ser un método de identificación ya estandarizado que resulta rápido y económico, y de fácil interpretación (Rodríguez, P. & Arenas, R., 2018).

Características Macroscópicas

La observación de las características macroscópicas de los microorganismos permite diferenciar las propiedades observables a simple vista, mismas que generan diferencias notables que pueden ayudar a la clasificación de las bacterias.

Morfología

El análisis morfológico, viene dado por la observación de las colonias bacterianas, mismas que representan un punto clave en la identificación preliminar de los microorganismos que se encuentran presentes en los medios. Es necesario utilizar medios generales y observar las colonias frescas para lograr ver su morfología, sin embargo, también es muy necesario tener un cultivo puro con los microorganismos que cumplan con las mismas características, pues esto nos asegura que provienen de un único tipo de microorganismo, esto genera que al ser del mismo tipo posean características como tamaño (grande, mediano, pequeño), forma (bordes y grosor), color (ausencia o presencia de pigmentos), textura (viscosa o seca) y consistencia(liso, rugoso o irregular) sea iguales (Fernández, A. *et al.*, 2010).

Cultivo

Es un método que nos permite conocer y controlar las formas de crecimiento de los microorganismos, así mismo, nos permite realizar su aislamiento e identificación a la sensibilidad de marcadores y antimicrobianos, si bien es el caso. Para realizar un cultivo, es

indispensable elegir de manera correcta el medio de crecimiento y las condiciones de conservación e incubación (Fernández, A. *et al.*, 2010).

Medios de Cultivo

Son el medio predilecto para que las bacterias puedan crecer, multiplicarse e incluso mantenerse. Para que estas bacterias aparezcan en los medios son necesarias condiciones nutricionales básicas como una fuente de energía, carbono, nitrógeno, algunos tipos de sales, agua y oligoelementos, además de un mínimo de 18-24 horas para su crecimiento. Los requerimientos necesarios dependen del tipo de microorganismo que se encuentre presente, por ello se tiene que considerar las condiciones óptimas en cuanto a la atmósfera, la temperatura y la nutrición que se le va a brindar al cultivo. Generalmente se tienen diferentes consistencias para los medios, estos pueden ser líquidos, sólidos o semisólidos, pero los más usados son los 2 primeros. Un cultivo sobre medios sólidos permite observar las características morfológicas y la disposición de las bacterias. Mientras que, en los medios líquidos, se da mejor el crecimiento y multiplicación al estar los nutrientes mucho más disponibles (Fernández, A. *et al.*, 2010).

Según su utilidad para el acogimiento y crecimiento bacteriano se tienen medios básicos o generales, enriquecidos, selectivos y diferenciales (Fernández, A. *et al.*, 2010).

Medio Agar Nutriente

Es un medio general que se puede utilizar en análisis de aguas y productos lácteos (APHA, 1998), en el cual se genera el crecimiento de la mayor parte de microorganismos que no poseen exigencias nutricionales muy elevadas. Es un medio color ámbar, con un pH de 7.4 ± 0.2 , que al ser inoculado necesita una incubación a $35 \pm 2^\circ\text{C}$, y se puede visualizar entre las 18 a 24 horas posteriores.

El medio Agar Nutritivo o nutriente, tiene una formulación sencilla y de fácil preparación (Rodríguez, C. & Zhurbenko R.,2018), ya que es utilizado para fines generales (Tabla 2).

Tabla 2.

Formulación de Agar Nutritivo.

Componente	Cantidad (g/L)
Peptona bacteriológica	5.0
Extracto nutritivo	1.0
Extracto de levadura	2.0
Cloruro de sodio	5.0
Agar	15.0

Nota. Componentes y cantidades necesarios para la preparación de Medio Agar Nutritivo.

Fuente: (Rodríguez, C. & Zhurbenko R.,2018).

Medio Agar MacConkey

Es un medio diferencial y selectivo, de color rosa violáceo, que posee un pH de 7.1 ± 0.2 cuando se encuentra a 25°C . Para este medio, después de realizar una siembra microbiana, es necesaria una incubación a $30\text{-}35^{\circ}\text{C}$, en aerobiosis, y su lectura va entre las 18 a 72 horas (Sharlau Microbiología, 2023; MacCONKEY, A.T., 1905).

El medio MacConkey está constituido de varios elementos y compuestos (Tabla 3), que permiten su utilidad a la hora de sembrar microorganismos (Sharlau Microbiología, 2023).

Tabla 3.*Formulación de Medio Agar MacConkey*

Componente	Cantidad (g/L)
Peptona de gelatina	17.0
Peptona de carne y caseína	3.0
Lactosa	10.0
Sales biliares	1.50
Cloruro sódico	5.00
Cristal violeta	0.001
Rojo neutro	0.03
Agar	15.0

Nota. Componentes y cantidades necesarios para la preparación de Medio Agar MacConkey.

Fuente: (Sharlau Microbiología, 2023).

Medio EMB

Es un tipo de medio selectivo, que generalmente permite la diferenciación y el aislamiento de enterobacterias. Este tipo de medio inhibe el crecimiento de bacterias Gram positivas, sin embargo, puede ser indicador de fermentación lactosa. Tiene una coloración púrpura, con un pH de 7.2 ± 0.2 , con una incubación aerobia necesaria a una temperatura de 33-37°C, durante 18-24 horas para poder observar el crecimiento bacteriano (Rodríguez, C. & Zhurbenko R.,2018).

El medio Agar Eosina Azul de Metileno, tiene una composición un tanto compleja para su preparación (Tabla 4), pues todos sus componentes son necesarios para una buena formulación, ya que de esta depende el desarrollo correcto de los microorganismos sembrados en él (Rodríguez, C. & Zhurbenko R.,2018).

Tabla 4.

Formulación del Medio Agar Eosina Azul de Metileno (EMB)

Componente	Cantidad (g/L)
Peptona bacteriológica	10.0
Lactosa	5.0
Sacarosa	5.0
Fosfato dipotásico	2.0
Eosina	0,4
Azul de metileno	0.065
Agar	15.0

Nota. Componentes y cantidades necesarios para la preparación de Medio EMB. Fuente: (Rodríguez, C. & Zhurbenko R.,2018).

Pruebas Bioquímicas

Son pruebas reactivas que permiten una lectura inmediata de la reacción entre el microorganismo y el reactivo, y sirven como un indicio preliminar a una identificación confirmatoria.

Prueba de la Catalasa

La catalasa es una enzima que poseen los microorganismos con citocromos, lo que permite que se hidrolice el peróxido de hidrógeno, es decir, que este se convierta en agua y oxígeno, dando como producto un burbujeo notable que representa una prueba positiva (Fernández, A. *et al.*, 2010; MacFaddin, 2003).

Prueba de la Ureasa

Es una prueba reactiva que permite determinar la capacidad de las bacterias de hidrolizar urea por medio de la presencia de las enzimas ureasas, esto permite la formación de

moléculas amonio. El complejo principal se genera de color naranja, y al reaccionar con los microorganismos que poseen ureasas se torna de color rojo, dando un resultado positivo, ya que existe variación de su pH que va de básico a ácido (MacFaddin, 2003).

Prueba de la Amilasa

Las amilasas son enzimas que generan la hidrólisis de enlaces glucosídicos que se encuentran en los polisacáridos, el almidón y el glucógeno (Van der Maarel, *et al.*, 2002). Los reactivos para el análisis de esta prueba son el almidón y el Lugol, que forman un complejo de color grisáceo, al entrar en contacto con las bacterias que poseen enzimas amilasas, el almidón se hidroliza y se torna incoloro, mostrando así una reacción positiva (MacFaddin, 2003).

Prueba de la Oxidasa

Permite determinar la existencia de enzimas oxidasas, debido a la presencia del sistema citocromo oxidasa que origina la oxidación de dicho citocromo y lo reduce a oxígeno molecular lo que produce agua o peróxido de hidrógeno. Generalmente este tipo de sistema se encuentra presente en bacterias aerobias, algunas anaerobias y facultativas (Fernández, A. *et al.*, 2010).

En los discos comerciales, el principio se basa en detectar la presencia de citocromo oxidasa, para ello la para-aminodimetilalinitina que es incolora reacciona y forma un compuesto de color azul (endofenol) (Bio Rad, 2003).

Pruebas de Identificación Molecular Bacteriana

Generalmente la identificación molecular bacteriana se realiza mediante la amplificación de genes, fragmentos o del ARN 16S. Los procesos previos a la extracción del DNA cromosómico y la amplificación son factores muy importantes para lograr una cantidad y calidad adecuada de DNA que permita una identificación correcta (Fernández, A. *et al.*, 2010). En una identificación molecular se deben considerar los siguientes pasos:

Extracción de DNA cromosómico

Al saber las dificultades y consideraciones de crecimiento de la bacteria, se puede realizar la extracción directamente o a través de un cultivo bacteriano. La extracción de DNA se realiza a partir de las muestras bacterianas en la etapa de crecimiento máximo, a través de métodos estandarizados o sistemas comerciales. Algunas de las veces, dependiendo el tipo de bacteria estos protocolos se pueden modificar, ya sea mejorar o simplificar para una mejor y más rápida extracción (Fernández, A. *et al.*, 2010).

Amplificación de DNA

El DNA extraído se utiliza como molde para la amplificación por PCR de una secuencia de ARNr 16S, esta tiene que poseer un tamaño que vaya de rango de entre 500-1500 pb. Juntamente con cebadores se amplifica la región del gen ARNr 16S en las bacterias. Para obtener una buena amplificación, es necesario realizar la electroforesis del producto de la PCR en un gel de agarosa, donde se debe obtener una única banda con el tamaño deseado (Fernández, A. *et al.*, 2010).

Secuenciación de DNA

Con los avances de la ciencia y la tecnología, se tienen nuevos e innovadores métodos de secuenciación que permiten conocer un sin número de secuencias con gran calidad y rapidez. La secuenciación es un proceso equivalente a la PCR, con la diferencia que los cebadores actúan de manera independiente. En la secuenciación no se generan moldes, sino se reutilizan de 25 a 35 ciclos programados. Las bases se marcan con fluorocromos o terminadores, mismos que pueden dar finalización a la síntesis de las secuencias, obteniendo finalmente una mezcla de DNA de diferentes tamaños. Según el tipo de secuenciador, capilares y variables de secuenciación, se puede disminuir el proceso, el tiempo, el costo y elevar el tamaño, y calidad de la secuenciación (Fernández, A. *et al.*, 2010).

Secuenciación Illumina

Es un tipo de secuenciación masiva de alto rendimiento y gran fidelidad en sus lecturas. Illumina es considerada una de las tecnologías de secuenciación de ácidos nucleicos de segunda generación más representativa de la Genómica, pues permite un análisis completo, no solo estructural, sino también funcional. Actualmente, se sitúa como el modelo de secuenciación referente o estándar, siendo una de las plataformas más confiable de lectura de DNA e identificación genómica (Valderrama, J. *et al.*, 2020).

La secuenciación Illumina, utiliza matrices y terminadores reversibles para alcanzar una secuenciación precisa y rápida. Las plantillas para la secuenciación se fijan a las celdas de flujo, lo que permite que el DNA y las enzimas se dispongan de manera correcta (Illumina, 2010).

Esta tecnología aplica una serie de pasos para lograr obtener una lectura de secuencias que permiten la identificación genómica del DNA que se analiza. Como primer paso, se prepara la muestra de DNA, aquí se ligan los adaptadores en cada extremo. Dentro de las celdas de flujo, se une los fragmentos de DNA en la superficie. Seguido, se agregan enzimas y nucleótidos sin marcar para empezar la amplificación de puente. En este proceso, las enzimas agregadas se adjuntan a los nucleótidos formando puentes bicatenarios. Después de ello, es necesaria una desnaturalización, para fijar plantillas monocatenarias al sustrato. Se empieza una amplificación completa, donde en las celdas fijadas se aglomera DNA bicatenario. En ese momento, se añaden cebadores, DNA polimerasa y primers etiquetados, las moléculas son excitadas con láser y esto se permite la identificación de la primera base, pues se atrapa la fluorescencia emitida por cada uno de los grupos de DNA. Se realiza nuevamente este ciclo, para determinar una nueva base, la imagen generada por el láser se registra y se obtiene la segunda base. Estos ciclos se repiten alrededor de 25-30 veces para determinar la secuencia de cada una de las bases existentes. Finalmente, cada uno de los datos obtenidos se alinean y

se realiza una comparación con bases de referencia, lo que permite identificar similitudes y diferencias entre secuencias nuevas y existentes (Illumina, 2010).

Capítulo III: Metodología

Ubicación geográfica

Mediante la gestión de HIDROAMBIENTAL CIA Ltda., empresa consultora ambiental, ubicada en Quito, Pichincha, en la calle Checoslovaquia E9-147, Edif. Bellagio (Figura 1), fueron proporcionadas las muestras de agua residual (lixiviados) para la investigación pertinente del presente proyecto.

Figura 1.

Ubicación geográfica de la empresa HIDROAMBIENTAL CIA Ltda.



Nota. Se puede observar la ubicación de la empresa a través de un micro mapeo. Fuente: (Google Maps, 2019).

Descripción de la Empresa

La empresa HIDROAMBIENTAL CIA Ltda., está centrada en la consultoría y remediación de aguas residuales, además de actividades como purificación de agua y su distribución, tratamientos de aguas industriales y de otros tipos, y captación de agua de ríos, lagos, pozos, etc. (EMIS, 2023).

Toma de muestras y escalamiento

A partir de las canecas de aguas residuales crudas proporcionadas por HidroAmbiental CIA. Ltda., se tomaron alícuotas de 2 L cada una para escalar los reactores a nivel de laboratorio simulando las condiciones necesarias para cumplir con el ambiente aerobio y anóxico previo al muestreo.

Plan de muestreo

Se tomó muestras de 50 mL en frascos plásticos estériles a partir de los reactores montados en el Laboratorio de Medio Ambiente de la Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE, para ser utilizadas posteriormente en el aislamiento de los microorganismos nativos, también fueron usadas para la medición de los parámetros iniciales ambientales de los lixiviados a remediar (Tabla 5).

El muestreo cumplió con las normas adecuadas de bioseguridad, de almacenamiento y transporte para asegurar la conservación de cada una de las muestras (NTE INEN, 2013).

Tabla 5.

Plan de muestreo

PLAN DE MUESTREO					
Persona Encargada: Lisette Arias					
Insumo: Agua residual cruda (lixiviados)					
Tipo de muestra	Código	Proceso de la muestra	Volumen	Fecha	Punto de muestreo
Agua residual	C1505	<ul style="list-style-type: none"> Aireación Hipoxia 	2 L	13/09/2023	Canecas con agua residual cruda facilitadas por HidroAmbiental
Muestra aireada	AE1805	<ul style="list-style-type: none"> Microbiológico Bioquímico Ambiental 	50 ml	16/09/2023	Biorreactor aerobio
Muestra anóxica	AN1805	<ul style="list-style-type: none"> Microbiológico Bioquímico 	50 ml	16/09/2023	Biorreactor anóxico

-
- Ambiental
-

Nota. La Tabla 5 resume el muestreo realizado para posterior análisis microbiológico, bioquímico y ambiental de las muestras de lixiviados.

Tratamiento muestra cruda

Las canecas de lixiviado proporcionadas por HidroAmbiental provienen de una fuente de agua residual cruda. La alícuota de 2 L extraída, se sometió a un acondicionamiento en laboratorio al realizar reactores aerobio y anaerobio durante un período de 3 días. Y, para asegurar que se mantuvieran las condiciones del ambiente adecuado, se determinó y controló el OD.

Medición de parámetros

Determinación de DQO

Con las muestras tomadas de los reactores, necesariamente se realizaron diluciones de 1:10 (1 mL de muestra y 9 mL de agua destilada), ya que para la determinación del DQO se utilizaron viales de rango bajo de 20 a 1500 mg/L. Dentro de los viales, previamente etiquetados y diferenciados, se colocaron 2 mL de las muestras diluidas. En el vial blanco, se colocaron 2 mL de agua destilada. Seguido de ello, se homogenizaron los viales para que reaccionen con las muestras colocadas y se colocaron en el digestor HACH DRB 200 en un tiempo de 2 horas y con una temperatura de 150°C (Seoanez, M., 2003).

Pasado el tiempo de digestión, es necesario esperar alrededor de 2 horas adicionales para que los viales estén completamente fríos y no existan interferencias al momento de la lectura. Mediante un espectrofotómetro HACH DR 5000, se realizaron las diferentes lecturas de los viales, pues este equipo determina la absorbancia que posee la muestra digestada en el vial, trabajando con una longitud de onda de 620 nm. Con el valor de la absorbancia y la curva de calibración del equipo (ecuación 5), se determina el valor de DQO que refleja cada una de las muestras analizadas.

Determinación de pH

Dentro de un vaso de precipitación, se colocó la muestra de agua residual. Seguidamente, con la ayuda del equipo medidor multiparamétrico HACH HQ40d multi, se conectó la sonda para medir pH, la misma que estaba calibrada. Dicha sonda se lavó con agua destilada, se secó con papel suave y se introdujo dentro de la muestra. En la pantalla del equipo, esperamos a que se estabilicen los valores de pH con sus unidades correspondientes, en este caso unidades de pH (Seoanez, M., 2003). Tomamos el valor arrojado por el equipo, retiramos la sonda de la muestra y enjuagamos el sensor con agua destilada para que no interfiera en las posteriores lecturas de pH de otras muestras.

Determinación de conductividad eléctrica

Dentro de un vaso de precipitación, se colocó la muestra de agua residual. Seguidamente, con la ayuda del equipo medidor multiparamétrico HACH HQ40d multi, se conectó la sonda para medir conductividad eléctrica, la misma que se encontraba calibrada. Dicha sonda se lavó con agua destilada, se secó con papel suave y se introdujo dentro del vaso con la muestra. En la pantalla del equipo, esperamos a que se estabilicen los valores de conductividad con sus unidades correspondientes, en este caso la lectura se da en mS/cm (Seoanez, M., 2003). Tomamos el valor arrojado por el equipo, retiramos la sonda de la muestra y enjuagamos el sensor con agua destilada para que no interfiera en las posteriores lecturas de conductividad de otras muestras.

Determinación de TDS

La conductividad se relaciona directamente con la cantidad de TDS en una muestra de aguas residuales (Seoanez, M., 2003), por ello, para calcular los TDS se utilizó la ecuación (1), tomando el factor de relación para aguas residuales y lixiviados:

$$TDS (mg/L) = 670 \times \text{conductividad} \quad (1)$$

Determinación de OD

Dentro de un vaso de precipitación, se colocó la muestra de agua residual. Seguidamente, con la ayuda del equipo medidor multiparamétrico HACH HQ40d multi, se conectó la sonda para medir oxígeno disuelto, la misma que se encontraba calibrada. Dicha sonda se lavó con agua destilada, se secó con papel suave y se introdujo dentro del vaso con la muestra. En la pantalla del equipo, esperamos a que se establezcan los valores de OD con sus unidades correspondientes, en este caso la lectura se da en mg O₂/ L (Rodríguez, 2005). Tomamos el valor arrojado por el equipo, retiramos la sonda de la muestra y enjuagamos el sensor con agua destilada para que no interfiera en las posteriores lecturas de OD de otras muestras.

Aislamiento de microorganismos

Para la determinación, caracterización e identificación de los microorganismos se realizaron una serie de procesos microbiológicos, bioquímicos y moleculares (Baird, 2005), mismos que fueron realizados en el laboratorio de Microbiología Molecular de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE, y que se describen a continuación.

Esterilización

El proceso de esterilización de los materiales de laboratorio y medios de cultivo utilizados en el proceso de la obtención y aislamiento de microorganismos se realizó en una autoclave a una temperatura de 121°C por 15 minutos. Este proceso se llevó a cabo previo a la realización de cualquier procedimiento microbiológico (Pérez-Pérez, 2018).

Medios de cultivo

La preparación de los medios adecuados para el crecimiento de los microorganismos es muy importante, por ello, como primer paso se eligió un medio general para asegurar el crecimiento de los microorganismos existentes en los lixiviados (Fernández, A. et al., 2010). El caldo Agar Nutriente se pesó y se preparó para 10 cajas Petri, 5 de ellas para las muestras

aerobias y las restantes para las anóxicas. Cada caja Petri, ocupa un volumen de 25 mL. La cantidad del medio se calculó mediante la ecuación (2) siguiendo las indicaciones de la etiqueta del medio:

$$\text{Agar Nutriente} = \frac{(\text{Agar por litro})(\text{Vol. total})}{1 \text{ Litro de agua}} \quad (2)$$

$$\text{Agar Nutriente} = \frac{(23\text{g})(250 \text{ mL})}{1000 \text{ mL}} = 5.75 \text{ g}$$

Se colocaron los 5.75 g de Agar Nutriente, y se diluyeron con 250 mL de agua destilada en un frasco Boeco, dentro de este se puso un agitador magnético, se llevó a la plancha de calentamiento a 200°C con agitación hasta que el medio esté totalmente homogenizado. Al terminar este proceso, se llevó las cajas Petri y el medio a la autoclave a las condiciones mencionadas en el proceso de esterilización. Al terminar el tiempo de esterilización, junto a un mechero se dispensaron 25 mL en cada caja Petri y se las dejó gelificar para su uso posterior (Rodríguez, C. & Zhurbenko R.,2018).

Diluciones

Las diluciones seriadas se realizaron a partir de las muestras de lixiviado con agua peptonada, para ello, en los distintos tubos de ensayo se colocaron 9 mL de agua peptonada con una pipeta y 1 mL de la muestra de lixiviado en el primer tubo, se homogenizó y se obtuvo con ello la primera dilución, es decir, 10^{-1} . De esta, se tomó 1 mL con la pipeta y se lo trasvasó al siguiente tubo de ensayo con 9 mL de agua peptonada, homogenizándolo y obteniendo así la dilución 10^{-2} (ReactLab, 2022). Este proceso se realizó continuamente hasta obtener diluciones de 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} para la muestra de lixiviado.

Siembra por extensión

Una vez obtenidos los agares solidificados en las cajas Petri, y las respectivas diluciones para las muestras de lixiviados, se realizó una siembra por extensión. Para este proceso, en cada caja Petri, sobre el agar se colocaron 10 μ L de cada uno de los tubos con las

diluciones correspondientes, y con la ayuda de una espátula drigalski (triángulo de siembra bacteriana), se distribuyó de manera homogénea la muestra alrededor de toda el área del Agar (Prescott L. *et al.*, 2004).

Este procedimiento, se realizó para todas y cada una de las cajas Petri con las diferentes diluciones obtenidas anteriormente.

Finalmente, las cajas sembradas se sellaron con Parafilm, se etiquetaron correctamente, se colocaron en una bolsa ziploc y se introdujo a la incubadora a 37°C. Se controló y monitoreo el crecimiento de las bacterias todos los días.

Siembra por estrías

Al existir un crecimiento bacteriano abundante en forma de biofilm en las cajas Petri sembradas por extensión, se sembraron las colonias obtenidas con la técnica de estrías para poder diferenciarlas de mejor manera y poder conseguir colonias puras. Para este proceso, se realizaron medios de cultivo de Agar Nutritivo, como se describió en ítems anteriores. Para la siembra, se utilizó un asa bacteriológica, y cerca de un mechero se destapó una por una las diferentes cajas Petri con el crecimiento masivo, con el asa previamente esterilizada con calor, se tomó una colonia y se realizó un estriado en zig-zag en la parte superior de la caja Petri, se giró la caja en sentido de la manecilla del reloj y partiendo del primer rayado, se arrastró nuevamente la muestra. Este proceso, se realizó alrededor de toda la caja hasta obtener 4 estrías separadas, esto tiene el fin de poder tener un crecimiento de bacterias, pero de manera más aislada (Prescott L. *et al.*, 2004). El asa bacteriológica fue esterilizada después de cada siembra en cada caja Petri, para evitar contaminación entre los distintos cultivos.

Finalmente, después de sembrar por estrías en cada una de las nuevas cajas Petri, se sellaron, etiquetaron y guardaron en una funda ziploc, para ser llevadas a la incubadora con temperatura de 37°C, y con un control y monitoreo diario.

Cultivos Puros

Con el fin de tener cultivos puros, se realizó medios de cultivo de Agar Nutritivo en tubos de ensayo con tapa rosca. Para ello, se preparó la cantidad de medio necesario, se esterilizaron tubos de ensayo y, posterior a ello, se dispensó alrededor de 10 ml en cada tubo. Estos se colocaron en posición inclinada aproximadamente a 30° de inclinación para lograr formar un pico de flauta en donde se inoculará las bacterias más adelante.

Una vez gelificado el medio en los tubos, se tomaron las colonias independientes crecidas en el Agar Nutritivo de la siembra por estrías. Con ayuda de un asa bacteriológica esterilizada, se tomó las colonias individuales de cada una de las cajas Petri, se introdujo en el tubo de ensayo y se realizó una siembra en zig-zag a lo largo de la superficie del medio (Prescott L. *et al.*, 2004). Este proceso, se llevó a cabo con cada una de las colonias diferenciadas, en diferentes tubos de ensayo. Al finalizar, estos se cerraron con las tapas rosca, se etiquetaron y se colocaron en un vaso de precipitación para ser llevados a incubación a 37°C y con control diario de su crecimiento (Rodríguez, C. & Zhurbenko R.,2018).

Caracterización e Identificación Microbiana

Para caracterizar e identificar las colonias obtenidas en los cultivos puros, es necesario someterlas a distintos tipos de pruebas, para poder clasificarlos y saber la clase de microorganismos que se encuentran presentes en las muestras, por ello, se realizó una serie de pruebas bioquímicas y moleculares que permitirán la identificación concreta de los microorganismos.

Pruebas Bioquímicas

Dentro de las pruebas bioquímicas para caracterizar las colonias obtenidas, se tienen pruebas con reactivos y medios diferenciales. Estos se aplicaron a las colonias de los cultivos puros previamente obtenidos, se registraron las variaciones que se obtuvieron en cada una de

ellas, y posteriormente, esto sirvió como criterio para seleccionar las cepas que fueron llevadas a identificación molecular.

Tinción de Gram

Este tipo de tinción diferencial nos permite reconocer microorganismos Gram Positivos y Gram Negativos dependiendo de la coloración que estos puedan retener al aplicar este protocolo de coloración. Para ello, se colocó la muestra con la ayuda de un asa bacteriológica sobre un portaobjetos que contenía una gota de agua destilada. Se mezcló dicha gota con la muestra del microorganismo colocado, se esparció a lo largo y ancho de la placa, y esta fue fijada con calor pasándola sobre la llama de un mechero, alrededor de 2 a 3 veces.

Una vez seca y fijada la muestra, se empezó colocando el colorante primario, es decir, el violeta de Genciana sobre todo el portaobjetos, y se lo dejó reposar durante 1 min. Luego, con ayuda de una piceta se enjuagó el exceso de colorante. A continuación, se colocó Lugol sobre toda la superficie, y actuó durante 1 min, y se lo retiró con agua destilada. Seguido de ello, se colocó alcohol-acetona como decolorante durante 30 seg, y se retiró con abundante agua destilada. Finalmente, como colorante de contraste, se usó safranina y se dejó actuar durante un tiempo de 60 seg, se enjuagó con agua destilada y el portaobjetos se dejó secar al ambiente, para posteriormente ser llevado a observación con el objetivo 100X en un microscopio Olympus (Delgado, A. *et al.*, 1994; Prescott L. *et al.*, 2004).

Prueba de Ureasa

Se preparó una solución de urea al 1% con rojo de fenilo, la misma que se colocó dentro de un tubo, obteniendo una coloración rojiza (MacFaddin, 2003). Con un asa bacteriológica estéril, se tomó una colonia del cultivo puro y se llevó al tubo con el reactivo, se puso en contacto y se agitó para observar la reacción existente mediante un cambio de coloración. Este proceso se realizó con cada una de las colonias puras.

Prueba de Catalasa

Para esta reacción se utilizó peróxido de hidrógeno al 10%, mismo que se colocó en un tubo y, con un asa bacteriológica estéril, se tomó una colonia del cultivo puro, se puso en contacto con el reactivo y se observó la reacción que se presenta mediante la presencia o ausencia de burbujeo (Fernández, A. et al., 2010; MacFaddin, 2003). Este proceso se realizó con cada una de las colonias puras.

Prueba de Amilasa

Se preparó una solución de almidón con iodo al 10%, la misma que se colocó en un tubo, obteniendo una coloración grisácea (MacFaddin, 2003). Con un asa bacteriológica estéril, se tomó una colonia del cultivo puro y se llevó al tubo con el reactivo, se puso en contacto y se agitó para observar la reacción existente mediante un cambio de coloración. Este proceso se realizó con cada una de las colonias puras

Prueba de Oxidasa

Se colocaron sobre una placa, discos comerciales para prueba de oxidasa que poseen el reactivo oxalato de P-aminodimetilanilina, estos con coloración blanquecina (BioRad, 2023). Con un asa bacteriológica estéril, se tomó una colonia del cultivo puro y se llevó sobre el disco, se extendió sobre el mismo poniendo la muestra en contacto con el reactivo existente, y se determinó la reacción como positiva o negativa mediante el cambio de coloración del disco. Este proceso se realizó con cada una de las colonias puras.

Medios Selectivos

Los medios selectivos permiten el crecimiento específico de ciertos microorganismos (Fernández, A. et al., 2010). En este caso, se seleccionó los medios MacConkey y EMB para controlar el crecimiento de los microorganismos obtenidos y poder clasificarlos, para su posterior identificación molecular.

Medio Agar MacConkey

Es un medio diferencial, que fue preparado con las indicaciones de su etiqueta, mismo que tiene una coloración roja (Sharlau Microbiología, 2023; MacCONKEY, A.T., 1905). Se elaboró el medio en un frasco Boeco, se llevó a la autoclave para su esterilización juntamente con cajas Petri. Una vez estériles, junto a la llama de un mechero, se dispensó el medio en las cajas Petri y se dejó enfriar. Una vez gelificado el agar, con el ayuda de un asa bacteriológica estéril, se tomó una colonia de los cultivos puros y se sembró mediante la técnica de estriado.

Las cajas Petri se sellaron con Parafilm, se etiquetaron y se colocaron en una bolsa ziploc, para llevar a incubación a 37°C, controlando diariamente su crecimiento.

Medio Agar Eosina y Azul de Metileno (EMB)

Es un medio diferencial, que fue preparado con las indicaciones de su etiqueta, mismo que tiene una coloración rojo vino intenso (Rodríguez, C. & Zhurbenko R.,2018). El medio se elaboró en un frasco Boeco, se llevó a la autoclave para su esterilización juntamente con cajas Petri. Una vez estériles, junto a la llama de un mechero, se dispensó el medio en las cajas Petri y se dejó enfriar. Una vez gelificado el agar, con el ayuda de un asa bacteriológica estéril, se tomó una colonia de los cultivos puros y se sembró mediante la técnica de estriado.

Las cajas Petri se sellaron con Parafilm, se etiquetaron y se colocaron en una bolsa ziploc, para llevar a incubación a 37°C, controlando diariamente su crecimiento.

Identificación Molecular

Caldos de multiplicación

Se realizaron medios de cultivo líquidos de agar nutritivo, mismo que se preparó en tubos de ensayo. Una vez obtenidos los medios estériles, con la ayuda de un asa bacteriológica, se tomó una colonia de los cultivos puros y se inoculó el medio líquido. Este procedimiento se realizó con cada una de las colonias puras seleccionadas (Prescott L. *et al.*,

2004). Una vez terminado este proceso, se taparon los tubos, se colocaron dentro de un vaso de precipitación y se llevaron a incubación por 4 días a 37°C de temperatura, y se controló su crecimiento día a día. Dichos caldos proporcionaron los microorganismos necesarios para la extracción de DNA que se realizó posteriormente.

Extracción de DNA

El proceso de extracción de DNA fue realizado en el laboratorio de Microbiología Ambiental (CENCINAT) de la Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE, y para ello se siguió el protocolo de CTAB, mismo que se detalla a continuación.

Luego de esterilizar en la autoclave todos los materiales necesarios para la extracción, se colocan perlas de ebullición dentro de un tubo eppendor de 2 mL, junto con 1 mL de caldo de cultivo que se preparó previamente. Se llevó a centrifugación a 1300 rpm por 3 minutos. Después, se retiró el sobrenadante creado en el tubo y seguido de ello se colocó el CTAB (buffer de extracción), se llevaron los tubos vórtex durante 2 minutos y a una intensidad de 9 de agitación. Terminado esto, se colocó 400 µL de cloroformo en el tubo y nuevamente se llevó al vórtex con las mismas condiciones anteriores. Culminado este tiempo, se llevó los tubos a incubación, a una temperatura de 50°C en un tiempo de 30 minutos, después se deja enfriar a temperatura ambiente y se llevó a la centrífuga durante 10 minutos con 1300 rpm.

Una vez terminado el proceso, se transfirió el sobrenadante formado producto de la agitación a un nuevo tubo eppendor de 2 mL, y adicionalmente, a este nuevo tubo se le colocó isopropanol. En estas condiciones, se lleva a incubar por 2 horas a una temperatura muy baja de -20°C. Transcurrido el tiempo adecuado, se volvió a centrifugar los tubos por 3 minutos a 1300 rpm. Se descarta el sobrenadante formado nuevamente. El pellet restante en el fondo del tubo se lavó con etanol y se volvió a centrifugar, este proceso se repitió 2 veces bajo las mismas condiciones (3 minutos, 13000 rpm). Finalmente, el pellet se dejó secar por 10 minutos en una zona estéril para que no se degrade. Una vez culminado este paso, se resuspendió el

pellet con agua ultrapura para PCR, y se colocó la RNAsa, se homogenizó a pequeños golpes y se llevó a incubación a 37°C por 30 minutos (Fernández, A. *et al.*, 2010).

Al terminar el proceso de extracción, las muestras de DNA extraído se almacenaron en un refrigerador a -20°C para evitar su degradación y para ser llevadas posteriormente a cuantificación y secuenciación.

Cuantificación de DNA

Para conocer qué cantidad de DNA se obtuvo después de la extracción realizada, fue necesaria realizar una cuantificación del material genético obtenido. Este proceso, fue realizado con la ayuda de un Nanodrop, equipo que se encuentra en el Laboratorio de Inmunología y Virología de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE. Con ayuda de un software llamado NanoDrop juntamente con una aplicación de ácidos nucleicos, se realizó la lectura en el equipo. Primeramente, se realizó la limpieza del lente del Nanodrop, y se colocó 2 µL de una solución tampón que sirvió de blanco para calibrar el equipo. Seguido de ello, se limpió nuevamente el lente, y se colocaron una a una las muestras de DNA extraído para su cuantificación, resultados que fueron arrojados en el ordenador, en las aplicaciones que controlan el equipo (Fernández, A. *et al.*, 2010).

Secuenciación de DNA

Posterior a la cuantificación, se seleccionaron las muestras con la cantidad adecuada de DNA extraído. Las muestras que cumplieron dichas condiciones fueron etiquetadas adecuadamente, colocadas en un tubo Falcon, selladas en una bolsa ziploc y se colocaron en un cooler conservando siempre la cadena de frío para evitar la degradación de las muestras. Una vez cumplido el protocolo adecuado para el transporte, estas fueron enviadas a la empresa BIOSEQUENCE S.A.S, en Pichincha, Quito ubicada en las calles Av. Checoslovaquia E10-195 y Eloy Alfaro (Figura 2), en donde se llevó a cabo el proceso de secuenciación de alto rendimiento o Secuenciación Ilumina (Fernández, A. *et al.*, 2010; Ilumina, 2010)

Figura 2

Ubicación geográfica de la empresa BIOSEQUENCE S.A.S.



Nota. Se puede observar la ubicación de la empresa a través de un micro mapeo, donde se realizó la secuenciación Illumina de las muestras de DNA extraído. Fuente: (Google Maps, 2019).

Ensayos de Biorremediación de Lixiviados

Caldos Bacterianos

Con los cultivos puros previamente obtenidos y almacenados a condiciones adecuadas en refrigeración, se procedió a realizar caldos microbianos de las cepas seleccionadas y secuenciadas, tanto aerobias como anóxicas, para realizar la multiplicación de estos microorganismos (Prescott L. *et al.*, 2004). Todos los materiales fueron previamente autoclavados y esterilizados para evitar cualquier tipo de contaminación.

Para cada caso, se tomó un matraz con 250 mL de medio agar nutritivo líquido, este fue inoculado con las cepas seleccionadas e identificadas. Se sellaron con un tapón de algodón y

se pusieron a incubar durante 4 días a una temperatura de 37°C, esperando su pico de crecimiento máximo (Borowitzka, 1999).

Montaje de Biorreactores

Al tener que recrear un reactor en el que se mantengan condiciones óxicas y anóxicas para favorecer el crecimiento de microorganismos y probar la capacidad degradadora de las bacterias aisladas, se montaron reactores con botellas de 6L, y en su interior poseían un 25% de su volumen con sorbetes de 2 cm de largo y un diámetro de 0.5 cm, formando una capa a manera de carrier.

Se montaron 6 ensayos, estos poseían 2 diferentes muestras de lixiviado (3 con cada muestra), además de tener sorbetes y una fuente de aireación para mantener en movimiento dicho carrier (BossTech, 2021). Dentro de cada bote, se colocaron 2 L de la muestra cruda de lixiviado.

Para los 3 primeros ensayos, se colocó el lixiviado 1 (P1-2), donde el reactor A poseía únicamente muestra cruda con sorbetes y aireación, el reactor B contenía la muestra cruda, sorbetes y adicional a ello una solución de remoción utilizada en una remediación tradicional proporcionada por HIDROAMBIENTAL juntamente con aireación y, finalmente, el reactor C, poseía la muestra cruda más el caldo de los microorganismos (Bioaumentación), sorbetes y su respectiva fuente de aireación.

Los 3 ensayos siguientes, se montaron al finalizar el ensayo anteriormente descrito, y para ello se colocó el lixiviado 2 (P9), donde el reactor D poseía únicamente muestra cruda con sorbetes y aireación, el reactor E contenía la muestra cruda, sorbetes y adicional a ello una solución de remoción utilizada en una remediación tradicional proporcionada por HIDROAMBIENTAL juntamente con aireación y, finalmente, el reactor F, poseía la muestra

cruda más el caldo de los microorganismos (bioaumentación), sorbetes y su respectiva fuente de aireación.

Bioaumentación

La bioaumentación ayuda a generar mayor cantidad de microorganismos nativos de manera biológica, para que cumplan su función de degradar la materia orgánica (Álvarez, A. & Suárez, J., 2006). Por ello, en cada uno de los ensayos, en los reactores C y F donde se hizo la bioaumentación, se colocaron 100 mL de caldo microbiano, este constaba de 50 mL de caldo con microorganismos aerobios, con una concentración de 77mg/L y 50 mL de caldo con microorganismos anóxicos con una concentración de 124 mg/L. Estas concentraciones fueron medidas con el turbidímetro en NTU, según la ecuación (3 y 4):

$$\text{Caldo Aerobio} = 231 \text{ NTU} \times \frac{1 \text{ mg/L}}{3 \text{ NTU}} = 77 \text{ mg/L} \quad (3)$$

$$\text{Caldo Anóxico} = 370 \text{ NTU} \times \frac{1 \text{ mg/L}}{3 \text{ NTU}} = 124 \text{ mg/L} \quad (4)$$

Estos fueron llevados a condiciones de aireación, en donde se pretende observar su actividad degradadora de materia orgánica, durante 7 días de tratamiento manteniendo las condiciones adecuadas y haciendo monitoreos diarios, además de mediciones de parámetros y observación de variaciones físicas (color) que este tratamiento biológico genere en los lixiviados.

Monitoreos

Los ensayos fueron observados diariamente, además se hicieron muestreos los días 0,3,5 y 7 para controlar los cambios de los parámetros ambientales y las propiedades físicas (color y olor) de principio a fin de la experimentación.

Medición de Parámetros Ambientales

Demanda Química de Oxígeno (DQO)

En cada una de las tomas de muestra, para la determinación de este parámetro, se colocaron 2mL de la muestra previa dilución (1:10) en los viales de DQO de bajo rango (20 - 1500 mg/L) (Seoánez, M., 2003), se digestaron por 2 horas a 150°C y se realizó la lectura en el espectrofotómetro con una absorbancia a 620 nm y una curva de calibración regida por la ecuación (5):

$$y = 0.0004X + 0.0009 \quad (5)$$

$$x = \frac{y - 0.0009}{0.0004}$$

Nota. la constante **y** es la absorbancia obtenida en las lecturas del espectrofotómetro, mientras que la constante **x** simboliza la concentración en ppm (valor de DQO).

Potencial Hidrógeno (pH)

En cada una de las tomas de muestra, con la ayuda del multiparámetro y la sonda de medición de pH, se determinó este parámetro durante los 4 días de muestreo. Se sumergió el sensor de la sonda en cada muestra y se esperó el tiempo adecuando hasta que el equipo se estabilice y en la pantalla arroje el valor de medición en unidades de pH (Seoánez, M., 2003).

Oxígeno Disuelto (OD)

En cada una de las tomas de muestra, con la ayuda del multiparámetro y la sonda de medición de OD, se determinó este parámetro durante los 4 días de muestreo. Se sumergió el sensor de la sonda en cada muestra y se esperó el tiempo adecuando hasta que el equipo se estabilice y en la pantalla arroje el valor de medición en mg/L de O₂, unidades correspondientes al parámetro (Rodríguez, 2005).

Turbidez

En cada una de las tomas de muestra, con la ayuda de un, se determinó este parámetro durante los 4 días de muestreo. Se colocaron alrededor de 25 mL en los frascos de cuarzo y se taparon, se limpiaron de manera externa con una toalla suave y se introdujeron en el equipo, se esperó el tiempo adecuado hasta que el equipo se estabilice y muestre en la pantalla el valor de medición de este parámetro en sus respectivas unidades, en este caso, NTU (Báez, 2008).

Conductividad Eléctrica

En cada una de las tomas de muestra, con la ayuda del multiparámetro y la sonda de medición de conductividad eléctrica, se determinó este parámetro durante los 4 días de muestreo. Se sumergió el sensor de la sonda en cada muestra y se esperó el tiempo adecuado hasta que el equipo se estabilice y en la pantalla arroje el valor de medición en mS/cm, unidades propias de la conductividad (Seoáñez, M., 2003).

Sólidos Disueltos Totales (TDS)

Los TDS están relacionados directamente con la conductividad eléctrica (Seoáñez, M., 2003), por ello, estos se rigen y se calculan con la ecuación (1):

$$TDS (mg/L) = 670 \times \text{conductividad} \quad (1)$$

Diseño Experimental

El diseño experimental para este proyecto fue completamente aleatorio, en donde se hace la comparación de los parámetros ambientales y fisicoquímicos de los lixiviados dentro de los diferentes ensayos. Se realizaron 2 ensayos, conformados con 3 reactores cada uno.

Tabla 6.*Descripción de los ensayos y tratamientos de los lixiviados*

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

Nota. Se muestra la descripción de cada ensayo y el contenido de cada uno de ellos.

Los tratamientos se determinaron por un DECA (diseño experimental completamente aleatorio), realizándose una prueba de ANOVA simple para determinar la varianza existente y significativa entre tratamientos. Mediante una prueba de Duncan (0.05 de valor de significancia) se compraron las medias de la experimentación, todo ello con ayuda del software InfoStat.

Tabla 7.*Diseño experimental*

Diseño experimental	DECA
<i>Tratamientos</i>	3
<i>Repeticiones</i>	2
<i>Unidades experimentales</i>	6
<i>Muestras por repetición</i>	1
<i>Muestras totales</i>	3

Hipótesis**Nula**

El tratamiento aplicado en cada reactor y la degradación de materia orgánica (disminución de DQO) no tienen una diferencia significativa, durante el periodo de 7 días de tratamiento.

Alternativa

El tratamiento aplicado en cada reactor y la degradación de materia orgánica (disminución de DQO) tienen al menos una diferencia significativa, durante el periodo de 7 días de tratamiento.

Variable de respuesta

Disminución del DQO / Aumento del porcentaje de remoción de DQO.

Factores:**Factor A**

Tipo de tratamiento aplicado (Tabla 6)

Factor B

Tiempo (0,3,5 y 7 días)

Capítulo IV: Resultados

Acondicionamiento y toma de muestras

En los reactores con agua residual cruda escalados a laboratorio, que se acondicionaron a ambientes anóxico y aerobio indistintamente, luego de los 3 días de acondicionamiento, se tomaron alícuotas de 50 mL para la cuantificación de los parámetros ambientales iniciales (Tabla 8), y, además, de estas muestras se realizaron los aislamientos de los microorganismos existentes en cada uno de los medios.

Tabla 8.

Parámetros ambientales iniciales de las muestras crudas.

Parámetro	Reactor Aerobio	Reactor Anóxico
DQO	6952 mg/L	7077 mg/L
pH	8.40	8.49
Conductividad	15.47 mS/cm	18.52 mS/cm
TDS	10364.9 mg/L	12408.4 mg/L
OD	2.12 mg/L	0.28 mg/L

Nota. En la tabla se muestran los valores iniciales de cada parámetro medido con los que se presenta el agua residual cruda (lixiviado), mismos que se utilizó para el aislamiento de microorganismos nativos.

Aislamiento de microorganismos.

De cada una de las muestras aerobia y anóxica obtenidas, después de realizar las siembras por diluciones seriadas, se observaron las cajas Petri con crecimiento separado en cada caso.

Para las muestras aerobias, las colonias se extrajeron de la siembra por dilución de 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} , ya que en estas existía presencia de colonias separadas y diferenciadas mismas que poseían características morfológicas notorias como color blanquecino, formas que iban de redondas a irregulares, y de tamaño pequeño a mediano (Figura 3). En la Tabla 9 se observan las características encontradas.

Tabla 9.

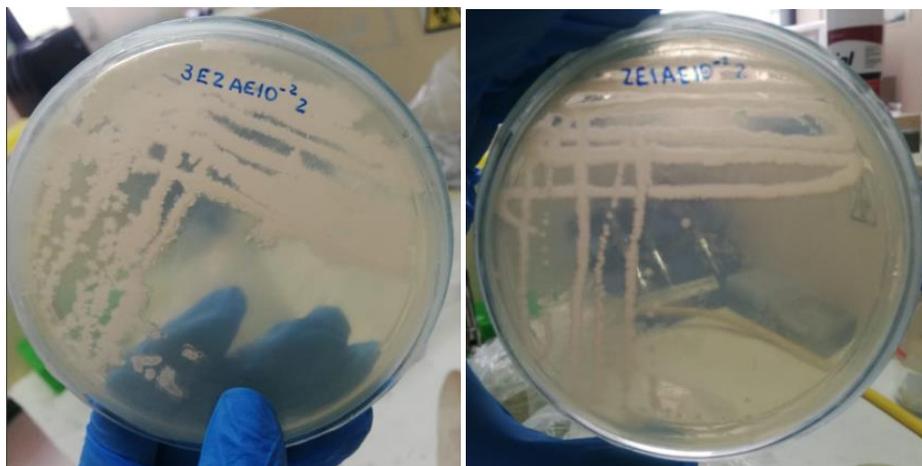
Características morfológicas de las colonias aerobias aisladas.

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

Nota. La tabla muestra a detalle cada una de las colonias extraídas de las muestras aerobias con sus diferentes características morfológicas macroscópicas observadas.

Figura 3.

Colonias aisladas con microorganismos aerobios.



Nota: Se muestran las cajas Petri con Agar Nutriente que contienen las colonias descritas anteriormente para el aislamiento de microorganismos.

En el caso de las muestras anóxicas se extrajeron las colonias de la siembra por dilución de 10^{-5} , estas presentaban colonias diferenciadas y aisladas unas de otras, y poseían características morfológicas como color blanquecino, formas que iban de redondas a irregulares, textura cremosa en su mayoría y un tamaño que iba de pequeño a mediano (Figura 4). Estos resultados se detallan en la Tabla 10.

Tabla 10.

Características morfológicas de las colonias anóxicas aisladas.

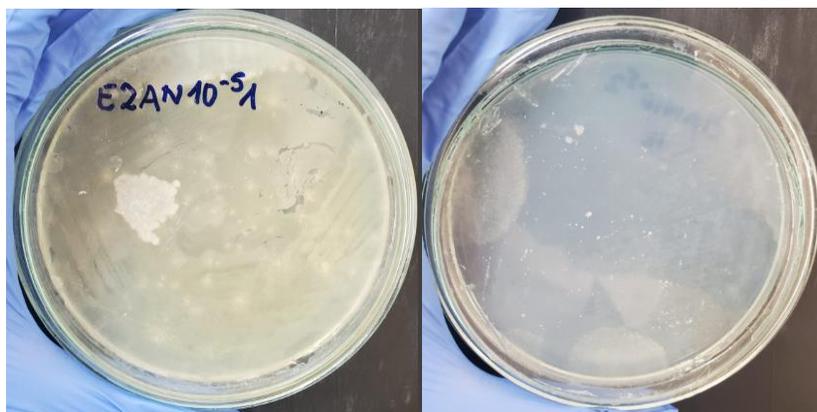
Muestra	Código	Color	Forma Macroscópica	Tamaño	Textura
E1AN10-5(1)	08AN	Blanca	Redonda	Mediana	Cremosa
E1AN10-5(2)	09AN	Blanca	Irregular	Mediana	Cremosa
E1AN10-5(3)	10AN	Blanca	Irregular	Pequeña	Cremosa

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

Nota. La tabla muestra a detalle cada una de las colonias extraídas de las muestras anóxicas con sus diferentes características morfológicas macroscópicas observadas.

Figura 4.

Colonias aisladas con microorganismos anóxicas.



Nota. Se muestran las cajas Petri con Agar Nutriente que contienen las colonias descritas anteriormente para el aislamiento de microorganismos.

Todas las colonias aisladas de las cajas Petri y caracterizadas morfológicamente en las tablas 9 y 10, se conservaron en los tubos con Agar Nutritivo en pico de flauta (Figura 5), para los posteriores análisis bioquímicos, moleculares y ambientales.

Figura 5.

Microorganismos aerobios y anóxicos en cultivos puros.



Nota: Se observa los tubos etiquetados con las diferentes cepas anóxicas y aerobias aisladas previamente.

Caracterización Bioquímica e Identificación Molecular

Análisis Bioquímico

Las características metabólicas que posee cada bacteria se ven evidenciadas a través de pruebas bioquímicas que muestran las diferencias o similitudes entre ellas, por ello, cada uno de los cultivos aislados en tubos con Agar Nutritivo en pico de flauta tanto aerobios como anóxicos, fueron caracterizados mediante la aplicación de pruebas bioquímicas entre las que constaron tinciones, pruebas reactivas y medios selectivos.

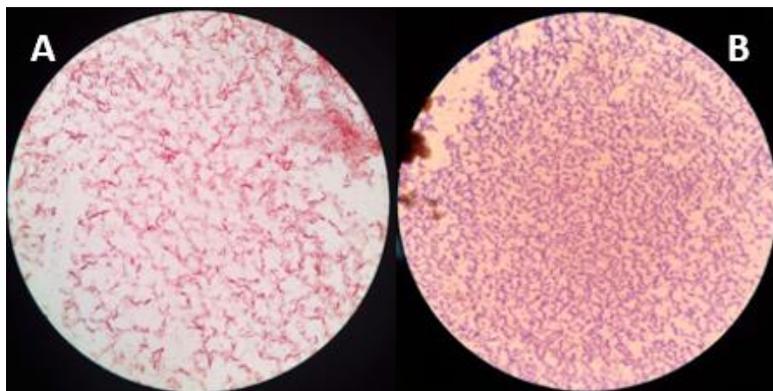
Tinciones

Tinción Gram

Los resultados obtenidos luego de aplicar la coloración de Gram fueron clasificados según la tonalidad que tomaron las bacterias de cada muestra, permitiendo diferenciar entre Gram negativas de color rosa y Gram positivas de color morado (Figura 6A y 6B).

Figura 6.

Muestra con bacterias Gram negativas y con bacterias Gram positivas.



Nota. Se observa al microscopio con un lente objetivo de 100X, en la imagen izquierda (A) Bacterias teñidas de color rosa por lo cual se identifican como Gram negativas y poseen forma de bacilos, mientras que, al lado derecho, (B) bacterias con forma de cocos/estreptococos y con coloración morada/lila siendo así Gram positivas.

En la Tabla 11 además de la diferenciación colorimétrica, también se muestra que, con la Tinción de Gram, se logró identificar las formas que posee cada bacteria, sean estas cocos, bacilos o cocobacilos según la observación al microscopio.

Tabla 11.

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

Nota. Se presenta los resultados de la Tinción Gram de las muestras aerobias y anóxicas. Se observan las formas que poseen las bacterias encontradas catalogadas como cocos, bacilos y/o cocobacilos.

Pruebas Reactivas

Prueba de Ureasa

Con esta prueba reactiva se logró identificar la capacidad de hidrolizar urea que presentaban los distintos tipos de bacterias, tanto aerobias como anóxicas (Tabla 12). Se evidenciaron bacterias ureasa positiva si la tonalidad era roja, mientras que las que conservaban el color naranja fueron ureasas negativas (Figura 7).

Figura 7*Prueba de reactividad de ureasa*

Nota. Se observa los microtubos con el reactivo de la prueba de ureasa que, al ser homogenizado con las colonias, dan como resultado (A) positivo en color rojo y (B) negativo en color naranja.

Prueba de Catalasa

Los resultados arrojan la reactividad del peróxido de hidrógeno con las colonias de los distintos tipos de bacterias (Tabla 12), así logramos obtener un resultado positivo si al homogenizarse el reactivo y las respectivas bacterias aerobias y anóxicas presentaban burbujeo, y si carecían de éste, el resultado era negativo (Figura 8).

Figura 8.*Prueba reactiva de catalasa*

Nota. Se observa los microtubos con el reactivo de la prueba de catalasa que, al ser homogenizado con las colonias, dan como resultado (A) positivo si presenta burbujeo y (B) negativo si carece de él.

Prueba de Amilasa

La hidrolisis de azúcares es la que determinó la presencia de amilasa en las bacterias tanto aerobias como anóxicas para determinar sus resultados (Tabla 12). Entonces, se tienen bacterias amilasas positivas si se mantiene la coloración blanquecina/ transparente, mientras que obtuvimos un resultado negativo si las bacterias cambian el reactivo a un color marrón oscuro (Figura 9).

Figura 9.

Prueba reactiva de amilasa



Nota. Se observa los microtubos con el reactivo de la prueba de amilasa que, al ser homogenizado con las colonias, dan como resultado (A) positivo si presenta coloración blanquecina/transparente y (B) negativo si el color de reactivo cambia a marrón oscuro.

Prueba de Oxidasa

Los resultados de cada una de las bacterias tanto aerobias como anóxicas, se determinaron por la reacción del cambio de color del disco comercial de oxidasa al probar la presencia o ausencia de enzimas oxidasas en las colonias (Tabla 12). Por ello, si el disco permanecía del color original, es decir blanquecino, la prueba es considerada negativa, mientras que, si al entrar en contacto con las bacterias este tomaba una coloración azulada/morada oscura, la prueba es oxidasa positiva (Figura 10).

Figura 10.

Prueba reactiva de oxidasa.



Nota. Se observa los discos del reactivo de la prueba de oxidasa que, al entrar en contacto y ser homogenizado con las colonias, dan como resultado (A) negativo si presenta coloración blanquecina o no hay reacción y (B) positivo si el color del disco cambia a una tonalidad azulada/morada oscura.

Tabla 12.

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	+	+	-	-

Nota. En la tabla 12, se observa el resumen de los resultados de las cuatro pruebas bioquímicas aplicadas a las colonias aerobias y anóxicas considerando el efecto causado al entrar en contacto la colonia y el reactivo. Prueba positiva (+). Prueba negativa (-).

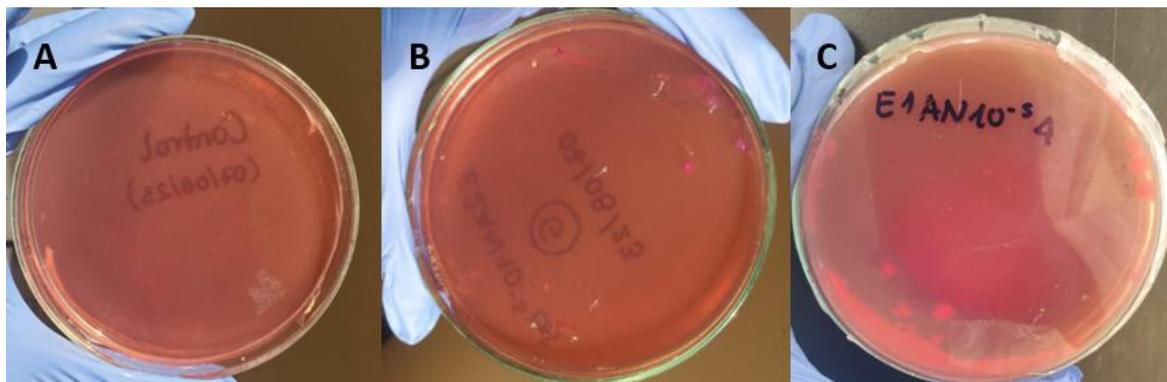
Medios Selectivos

Medio Agar MacConkey

Al ser un medio selectivo y también diferencial, los resultados evidenciados en esta prueba permitieron observar el crecimiento de las colonias, siendo positivo o negativo por la presencia o ausencia de colonias, y la diferenciación del color de estas, pues estas colonias podían presentar una coloración rosada o una coloración blanquecina (Figura 10), esto se puede resumir y evidenciar en la tabla 13.

Figura 10.

Crecimiento en el medio selectivo y diferencial Agar MacConkey



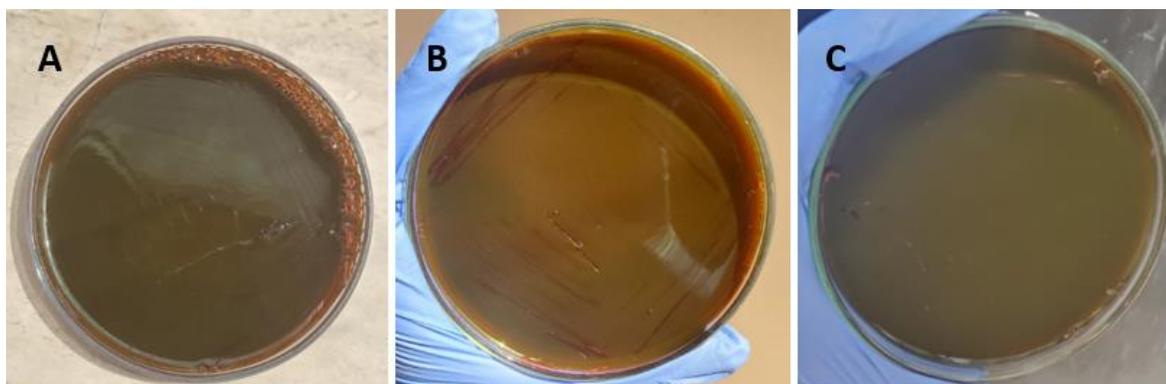
Nota. Se observa, los resultados de crecimiento de microorganismos en el Agar MacConkey, teniendo (A) la ausencia de crecimiento, (B) crecimiento de colonias de color rosa y (C) crecimiento de colonias en color blanquecino.

Medio Agar Eosina y Azul de Metileno

En este medio, se obtuvieron resultados positivos al presenciar crecimiento de colonias, mientras que se reportó como negativo al tener ausencia de ellas. Al tener resultados positivos, también se discriminó el color de estas colonias, mismas que presentaban una coloración morada metálica o incoloras (Figura 11). En la tabla 13 se puede observar en resumen los resultados de las colonias aerobias y anóxicas obtenidas para el medio EMB.

Figura 11.

Crecimiento en el medio Agar Eosina y Azul de Metileno (EMB)



Nota. Se observa, los resultados de crecimiento de microorganismos en el Agar MacConkey, teniendo (A) la ausencia de crecimiento, (B) crecimiento de colonias de color morado metálico y (C) crecimiento de colonias incoloras.

Tabla 13.

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
ANÓXICA	08AN	-	SC	+	SC

09AN	-	SC	-	SC
10AN	-	SC	+	Morado
11AN	+	Rosada	-	SC
12AN	+	Rosada	+	Morado
13AN	+	Rosada	+	Morado
14AN	+	Rosada	+	Morado

Nota. En la tabla 13, se observa el resumen de los resultados de los dos medios selectivos y diferenciales aplicados a las colonias aerobias y anóxicas considerando la ausencia y presencia de colonias bacterianas en cada una, además de definir la coloración de las colonias que se encuentran presentes en cada medio. Prueba positiva/ Presencia de colonias (+). Prueba negativa/ Ausencia de colonias (-). Sin colonias (SC).

Análisis Molecular

En la identificación molecular, se tomó en cuenta los cultivos previamente aislados y caracterizados bioquímicamente, por ello se eligieron los que presentaban características diferentes y notorias a nivel macro y microscópico. Estos cultivos fueron tanto aerobios (04AE, 05AE, 06AE y 07AE) como anóxicos (09AN, 10AN, 13AN Y 14AN), mismos de los que se extrajo su DNA indistintamente por el protocolo de CTAB, y llevados a cuantificación para observar los resultados.

Cuantificación de DNA

Al culminar con la extracción de DNA, el material genético obtenido fue llevado a lectura al Nanodrop, mismo que arrojó los resultados que se reflejan en la tabla 14, donde se muestran los valores de concentración de la muestra, la pureza del DNA obtenido y la existencia de RNA en cada muestra analizada.

Tabla 14.

Resultados de cuantificación de DNA bacteriana.

Muestra	Ácido Nucleico	Unidades	A260 (Abs)	A280 (Abs)	260/280	260/230	Tipo de muestra	Factor
MUESTRAS AEROBIAS								
Blanco	-0.1	ng/μl	-2	-3	0.58	-0.71	DNA	50.00
04AE	4.3	ng/μl	85	47	1.80	0.53	DNA	50.00
05AE	223.6	ng/μl	4.471	2.450	1.83	1.16	DNA	50.00
06AE	44.3	ng/μl	886	422	2.10	1.91	DNA	50.00
07AE	3.9	ng/μl	78	42	1.86	0.63	DNA	50.00
MUESTRAS ANÓXICAS								
Blanco	0.2	ng/μl	0.004	-0.002	-2.07	0.38	DNA	50.00
09AN	2.9	ng/μl	0.058	0.029	2.02	0.72	DNA	50.00
10AN	6.6	ng/μl	0.131	0.075	1.75	1.36	DNA	50.00
12AN	8.0	ng/μl	0.160	0.087	1.85	1.16	DNA	50.00
14AN	28.5	ng/μl	0.571	0.292	1.95	1.45	DNA	50.00

Nota. En la tabla se puede observar los resultados de la cuantificación de DNA de las muestras aerobias y anóxicas posterior a la extracción de su material genético mediante el protocolo de CTAB.

Las muestras aerobias **05AE** (2E1AE10-3(1)), **06AE** (2E2AE10-1(2)) y la muestra anóxica **14AN** (2E2AN10-5(1)) presentaron una cantidad significativa de DNA, además de cumplir con los ratios requeridos para ser llevadas al proceso de secuenciación, por estas características, estas 3 muestras fueron seleccionadas para ser enviadas a identificación molecular con secuenciación de alto rendimiento.

Secuenciación de Alto Rendimiento

Mediante la secuenciación de alto rendimiento, Illumina, se determinó la identificación de género y familia de las especies bacterianas más abundantes en cada una de las 3 muestras secuenciadas, estos resultados se muestran y se resumen en la tabla 15.

Tabla 15.

Identificación taxonómica bacteriana por secuenciación de alto rendimiento, Illumina.

Muestra	Microorganismo Identificado	% Reads Totales
05AE	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	65.84%
	<i>Brevudimonas diminuta</i>	29.82%
06AE	<i>Bacillus licheniformis</i>	54.92%
	<i>Bacillus sonorensis</i>	37.60%
	<i>Bacillus idriensis</i>	6.54%
14AN	<i>Bacillus licheniformis</i>	83.04%
	<i>Bacillus sonorensis</i>	15.94%

Nota. Se presenta los resultados de las especies bacterianas más abundantes y de importancia remediadora de las muestras secuenciadas por Illumina.

En los resultados de la secuenciación de alto rendimiento, encontramos bacterias de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Brevudimonas*, mismas que poseen un porcentaje significativo dentro de cada una de las muestras analizadas y son de importancia para remediación ambiental. La bacteria *Bacillus licheniformis* cuenta con alto porcentaje en 2 de las muestras, tanto aerobia como anóxica, por ello mediante investigación bibliográfica se afirma ser una bacteria facultativa.

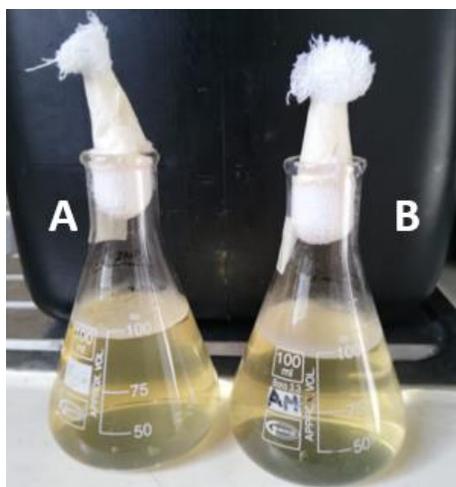
Ensayos de Biorremediación de Lixiviados

Caldos Bacterianos

Se obtuvo un volumen de 200 mL caldos bacterianos en los Erlenmeyer, tanto aerobio (100 mL) como anaerobio (100 mL) con una concentración de 231 NTU (77 mg/L) y 370 NTU (124 mg/L) respectivamente (Figura 12).

Figura 12.

Caldos bacterianos para bioaumentación.



Nota. Se observa el caldo nutriente de los distintos cultivos, (A) caldo con microorganismos aerobios y (B) caldo con microorganismos anóxicos.

Muestras

Las muestras obtenidas para los análisis de los diferentes parámetros a lo largo del tiempo establecido (7 días), se realizaron a partir de los reactores escalados a laboratorio en los que se colocaron sorbetes y agua cruda/lixiviado (Figura 13), más una fuente de aireación (Figura 14). En cada muestreo, se extrajeron 30 ml en frascos estériles para analizar los parámetros ambientales que requiere la experimentación (Figura 15).

Figura 13.

Reactores escalados a laboratorio.



Nota. Se observa los reactores escalados a nivel de laboratorio de los distintos experimentos. Reactores A, B y C con muestra de lixiviado 1 (P1-2). Reactores D, E y F con muestra de lixiviado 2 (P9).

Figura 14.

Reactores escalados a nivel de laboratorio con fuente de aireación.



Nota. Los reactores se dispusieron en un espacio abierto, conectados con una fuente de aireación (aireadores mecánicos con difusores de aire), para poder generar movimiento en los sorbetes y desplazamiento de aire en todo el contenedor con lixiviado.

Figura 15.

Fascos de muestras tomadas de los reactores.



Nota. Se observa los frascos estériles en refrigeración de las muestras de cada uno de los reactores en los diferentes tiempos para los posteriores análisis de parámetros ambientales.

Monitoreos y Parámetros de Control

Propiedades Organolépticas

Las características que fueron evaluadas en los distintos tratamientos fueron su olor y color al pasar del tiempo, viendo cambios significativos desde el día 0 hasta el día 7 (Tabla 16). El color varió de negro a café (Figura 16), mientras que el olor característico de lixiviado fue disminuyendo a lo largo de los días. Esto fue mucho más notorio en los reactores C y F (3 días), mientras que tardó un poco más en el resto de los tratamientos.

Tabla 16.

Propiedades organolépticas de los tratamientos de lixiviados.

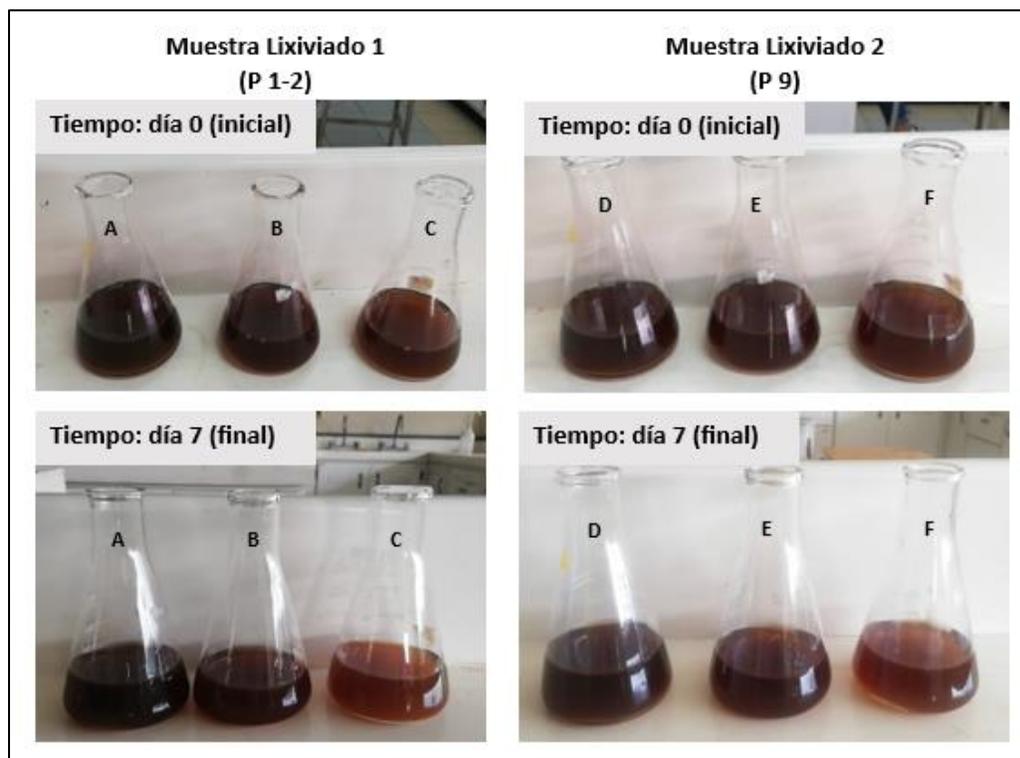
Muestra	Tratamiento	Tiempo (días)	Color	Olor
Lixiviado 1 (P 1-2)	Reactor A	t0	Negro	Desagradable
		t3	Café oscuro	Desagradable
		t5	Café oscuro	Desagradable

		t7	Café	Disminución de olor
	Reactor B	t0	Negro	Desagradable
		t3	Café oscuro	Desagradable
		t5	Café oscuro	Desagradable
		t7	Café	Disminución de olor
	Reactor C	t0	Negro	Desagradable
		t3	Café	Desagradable
		t5	Café	Disminución de olor
		t7	Café claro	Disminución de olor
	Reactor D	t0	Negro	Desagradable
		t3	Café oscuro	Desagradable
		t5	Café oscuro	Desagradable
		t7	café	Disminución de olor
Lixiviado 2 (P 9)	Reactor E	t0	Negro	Desagradable
		t3	Café oscuro	Desagradable
		t5	Café oscuro	Desagradable
		t7	Café	Disminución de olor
	Reactor F	t0	Negro	Desagradable
		t3	Café	Desagradable
		t5	Café	Disminución de olor
		t7	Café claro	Disminución de olor

Nota. Resumen de las propiedades organolépticas más notorias de los tratamientos con los distintos tipos de lixiviados 1 y 2.

Figura 16.

Variación de color en los distintos tratamientos de lixiviados.



Nota. Se muestra el cambio de tonalidad que existe desde el día inicial (t_0) en comparación del día final (t_7) de los distintos tratamientos aplicados en los lixiviados 1 y 2.

Parámetros Ambientales

Se determinó la DQO de cada una de las muestras tomadas a lo largo del tiempo para mostrar el porcentaje de degradación de la materia orgánica presente en los lixiviados con los diferentes tratamientos (Tabla 18). Además, se analizaron otros 5 parámetros como conductividad, pH, OD, turbidez y TDS (Tabla 17), para corroborar los resultados de disminución de DQO.

Determinación de Conductividad, pH, OD, Turbidez y TDS

A partir de los ensayos realizados, se determinó que los parámetros como conductividad y TDS disminuyen a lo largo de los 7 días de los distintos tratamientos. Además, en parámetros

como el pH y el OD, se muestran un incremento en su valor. Mientras que la turbidez, muestra un aumento en su valor del día 0 al 3 debido a la bioaumentación, y del día 3 al 7 se observa un decrecimiento en los NTU, debido al consumo de la materia orgánica (Tabla 17). Todos estos resultados hacen alusión a que los tratamientos tienen efectividad en disminuir la cantidad de materia orgánica presente en los lixiviados, y se puede resaltar que los reactores C y F, que contenían los microorganismos aislados, son los que tienen mejores resultados que otros tratamientos en los reactores.

Tabla 17.

Parámetros ambientales medidos en los distintos reactores en el tiempo.

Reactor	Tiempo	Conductividad (mS/cm)	pH	OD (mg/L)	Turbidez (NTU)	TDS (mg/L)
LIXIVIADO 1 (P 1-2)						
A	0	23.9	8.16	0.21	180	16013
	3	22.8	9.03	0.72	461	15276
	5	19.76	9.28	2.61	445	13239.2
	7	18.35	9.52	4.42	377	12294.5
B	0	23.9	8.16	0.21	180	16013
	3	20.44	9.32	0.75	441	13694.8
	5	18.20	9.51	3.38	433	12194
	7	16.92	9.61	5.24	362	11336.4
C	0	23.9	8.16	0.21	180	16013
	3	20.39	9.23	0.64	668	13661.3
	5	18.11	9.47	2.39	585	12133.7
	7	16.60	9.59	4.06	466	11122

LIXIVIADO 2 (P 9)						
D	0	29.6	8.19	0.81	292	19832
	3	25.4	9.25	1.44	268	17018
	5	21.11	9.52	4.09	253	14143.7
	7	18.75	9.63	6.69	228	12562.5
E	0	29.6	8.19	0.81	292	19832
	3	21.65	9.34	1.38	275	14505.5
	5	20.17	9.54	4.36	268	13513.9
	7	17.83	9.71	6.84	227	11946.1
F	0	29.6	8.19	0.81	292	19832
	3	21.20	9.32	1.43	290	14204
	5	19.96	9.52	4.18	258	13373.2
	7	17.91	9.68	6.43	236	11999.7

Nota. La tabla resume algunos parámetros medidos para la determinación de la calidad del agua residual (lixiviado 1 y 2).

Determinación de DQO

A partir de los ensayos realizados, se determinó el valor de DQO de cada muestra a los 0,3,5 y 7 días, donde se observó una disminución a partir del día 3 en adelante, en todos los tratamientos (Tabla 18, Figura 17). También, se analizó el porcentaje de disminución de la DQO (Tabla 19, Figura 18), donde se observó que los reactores con bioaumentación, es decir, los reactores C (lixiviado 1) y F (lixiviado 2) tuvieron una mayor eficiencia en remoción de materia orgánica, ya que lograron una disminución del 21.90% y 44.66% de DQO respectivamente en 7 días de tratamiento, en comparación de los otros tratamientos.

Tabla 18.

Valores de DQO (mg/L) medidos en el tiempo de los distintos tratamientos.

Muestra	Tratamiento	Tiempo (días)	DQO
Lixiviado 1 (P1-2)	Reactor A	0	4452.5
		3	4027.5
		5	3852.5
		7	3577.5
	Reactor B	0	4452.5
		3	4127.5
		5	3952.5
		7	3527.5
	Reactor C	0	4452.5
		3	3977.5
		5	3627.5
		7	3477.5
Lixiviado 2 (P9)	Reactor D	0	4702.5
		3	4577.5
		5	4502.5
		7	4402.5
	Reactor E	0	4702.5
		3	3877.5
		5	3602.5
		7	2727.5
	Reactor F	0	4702.5

3	3552.5
---	--------

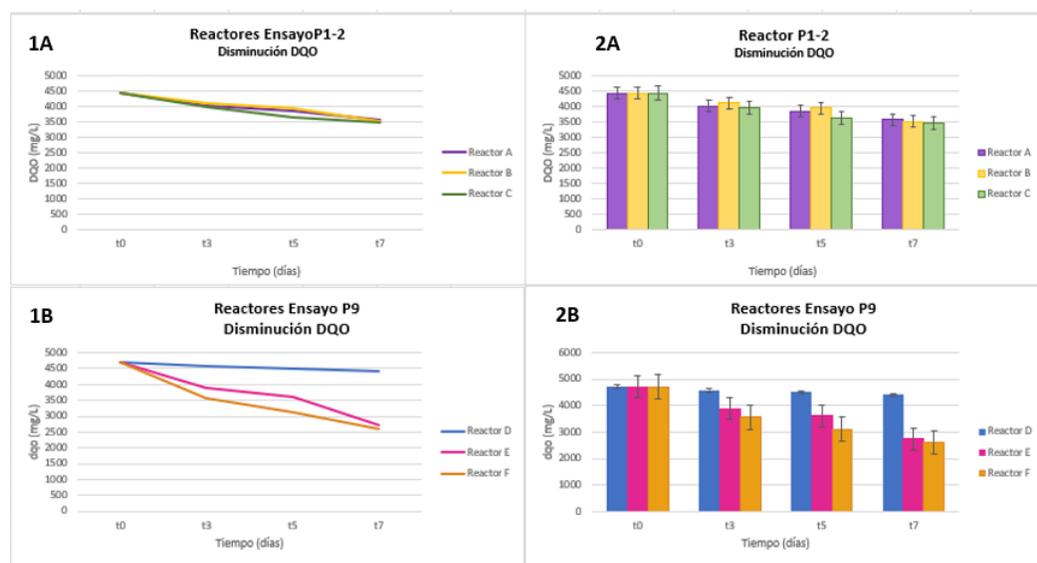
5	3102.5
---	--------

7	2602.5
---	--------

Nota. La tabla resume los valores obtenidos al relacionar la absorbancia obtenida en los viales de DQO y la curva de calibración del equipo para obtener el resultado final de DQO de cada una de las muestras de los tratamientos en los reactores.

Figura 17.

Gráficas de tendencia de disminución de valor de DQO en los diferentes ensayos.



Nota: Se muestran gráficas lineales y en barras que representan los valores obtenidos en el análisis de DQO, mismos que disminuyen a lo largo del tiempo de tratamiento. (1A y 2A) Gráficas de reactores A, B y C (lixiviado 1), donde se muestra mayor disminución de DQO en el reactor C (bioaumentación). (1B y 2B) Gráficas de reactores D, E y F (lixiviado 2), muestra mayor disminución el tratamiento de bioaumentación del reactor F.

Tabla 19.

Porcentajes de disminución de DQO en los diferentes tratamientos.

Muestra	Tratamiento	Tiempo (días)	% Remoción DQO
Lixiviado 1 (P1-2)	Reactor A	0	---
		3	9.55 %
		5	13.48 %
		7	19.65 %
	Reactor B	0	---
		3	7.30 %
		5	11.23 %
		7	20.77 %
	Reactor C	0	---
		3	10.67 %
		5	18.53 %
		7	21.90 %
Lixiviado 2 (P9)	Reactor D	0	---
		3	2.66 %
		5	4.25 %
		7	6.38 %
	Reactor E	0	---
		3	17.54 %
		5	23.39 %
		7	42.00 %
Reactor F	0	---	

3	24.46 %
---	---------

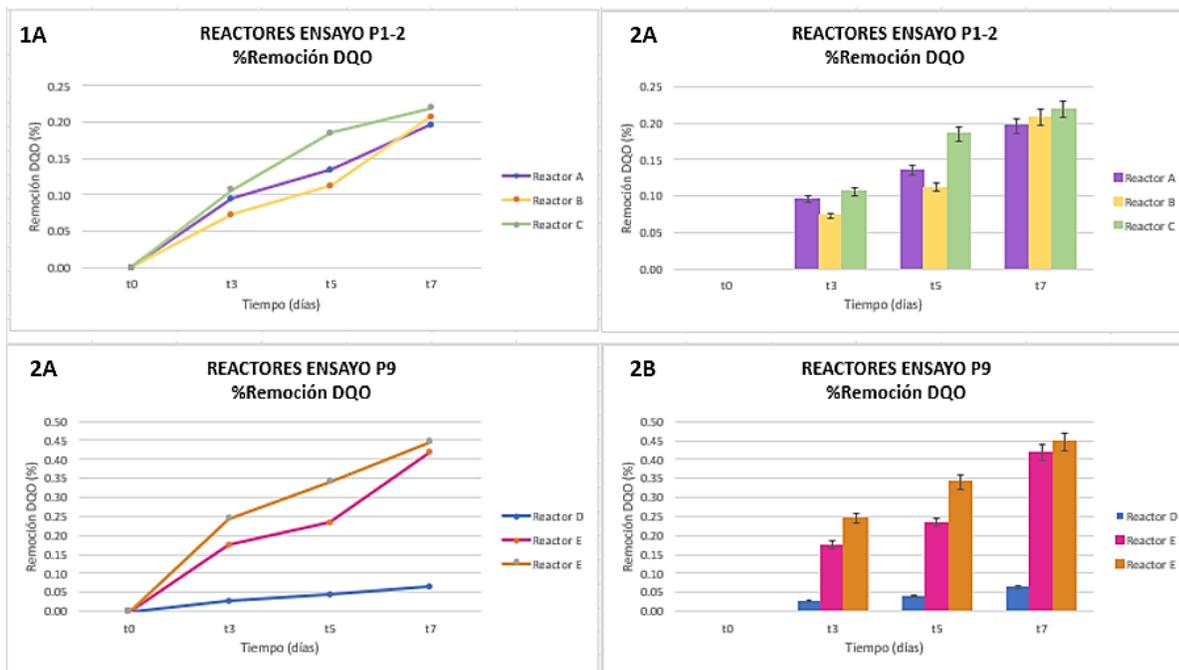
5	34.02 %
---	---------

7	44.66 %
---	---------

Nota. La tabla resume los porcentajes de disminución de DQO desde el día 0 hasta el día 7 de tratamiento, viéndose una mayor eficiencia de disminución en los reactores C y F, donde se encontraba la bioaumentación, estos con un porcentaje del 21.90% y 44.66% respectivamente, siendo los porcentajes de remoción más altos alcanzados en la experimentación.

Figura 18.

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



Nota. Se muestran gráficas lineales y en barras que representan los porcentajes de remoción de DQO, mismos que aumentan a lo largo del tiempo de tratamiento. (1A y 2A) Gráficas de reactores A, B y C (lixiviado 1), donde se muestra una mayor remoción de DQO en el reactor C (bioaumentación). (1B y 2B) Gráficas de reactores D, E y F (lixiviado 2), muestra mayor porcentaje de remoción en el tratamiento de bioaumentación del reactor F.

Análisis Estadístico

Mediante análisis estadístico se determinó la relación entre los tipos de lixiviados, la eficiencia de los tratamientos y la disminución de DQO en función del tiempo, sustentando así los resultados experimentales mediante un análisis de varianzas ANOVA con la aplicación de un Test de Duncan.

En la tabla 20, se muestran los datos experimentales con los que se generaron gráficas de interacción para mostrar la eficiencia de disminución de DQO en el tiempo, así como también la relación con los lixiviados 1 y 2 (Figura 19).

Al ser los mismos tratamientos con diferentes lixiviados, la mejor manera de realizar un trabajo estadístico en este modelo experimental es diferenciarlos por los tipos de reactores usados, es así como los reactores aireados son A y D, los reactores tradicionales son B y E, mientras que los Reactores Bioaumentación son C y F, perteneciendo los primeros al lixiviado 1 y los segundos al lixiviado 2.

Tabla 20.

Datos experimentales de disminución de DQO

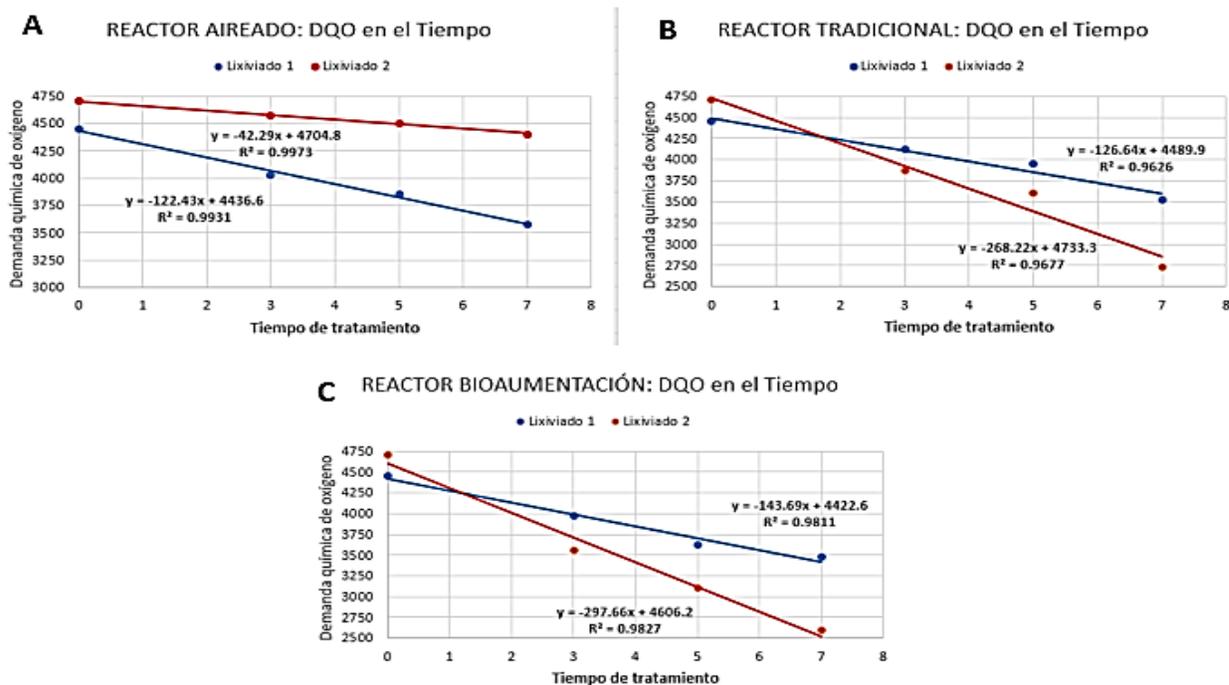
Lixiviado	Reactor	Tiempo	DQO (mg/L)
Lixiviado 1	R. Aireado	0	4452.5
Lixiviado 1	R. Aireado	3	4027.5
Lixiviado 1	R. Aireado	5	3852.5
Lixiviado 1	R. Aireado	7	3577.5
Lixiviado 1	R. Tradicional	0	4452.5
Lixiviado 1	R. Tradicional	3	4127.5
Lixiviado 1	R. Tradicional	5	3952.5
Lixiviado 1	R. Tradicional	7	3527.5
Lixiviado 1	R. Bioaumentación	0	4452.5
Lixiviado 1	R. Bioaumentación	3	3977.5
Lixiviado 1	R. Bioaumentación	5	3627.5
Lixiviado 1	R. Bioaumentación	7	3477.5
Lixiviado 2	R. Aireado	0	4702.5

Lixiviado 2	R. Aireado	3	4577.5
Lixiviado 2	R. Aireado	5	4502.5
Lixiviado 2	R. Aireado	7	4402.5
Lixiviado 2	R. Tradicional	0	4702.5
Lixiviado 2	R. Tradicional	3	3877.5
Lixiviado 2	R. Tradicional	5	3602.5
Lixiviado 2	R. Tradicional	7	2727.5
Lixiviado 2	R. Bioaumentación	0	4702.5
Lixiviado 2	R. Bioaumentación	3	3552.5
Lixiviado 2	R. Bioaumentación	5	3102.5
Lixiviado 2	R. Bioaumentación	7	2602.5

Nota. Se muestra los tipos de tratamientos en los reactores según el lixiviado utilizado en cada caso (lixiviado 1 y lixiviado 2), los tiempos de tratamiento en cada caso y el DQO generado en el análisis durante el tiempo en que se realizó la experimentación.

Figura 19.

Gráficas de interacción de Disminución de DQO en función del tiempo según el tipo de tratamiento.



Nota. Se observa la relación de disminución de DQO en función del tiempo y del lixiviado que contiene cada tipo de reactor, además del factor R^2 que muestra un modelo experimental con gran precisión (>0.95); y la ecuación lineal de la línea de tendencia en cada caso donde la pendiente negativa indica la cantidad de disminución progresiva de DQO en el tiempo. (A) Reactor Aireado, muestra mayor disminución a los 7 días con el lixiviado 1. (B) Reactor Tradicional, muestra mayor disminución a los 7 días con el lixiviado 2. (C) Reactor Bioaumentación, muestra mayor disminución a los 7 días con el lixiviado 2.

En la Tabla 21 de doble entrada, se resume los promedios de DQO para cada uno de los lixiviados según el tipo de tratamiento al que fueron sometidos indistintamente. Con ello, se generan gráficas de interacción donde se observa el DQO promedio según el tipo de tratamiento (Figura 20) y la relación entre el DQO promedio y el tipo de lixiviado (1 y 2) que se remedió (Figura 21).

Tabla 21.

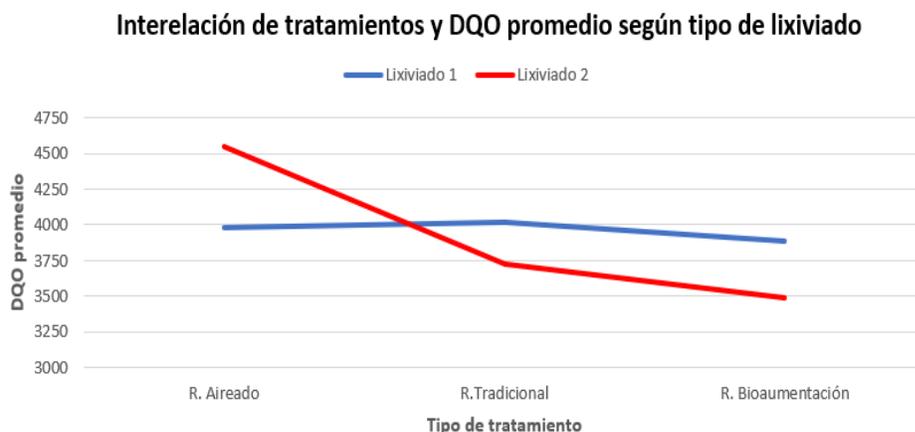
Promedio de DQO por tipo de tratamiento aplicado en cada lixiviado.

		Tipo de tratamiento		
		R. Aireado	R. Tradicional	R. Bioaumentación
Lixiviado	Lixiviado 1	3977.50 mg/L	4015.00 mg/L	3883.75 mg/L
	Lixiviado 2	4546.25 mg/L	3727.50 mg/L	3490.00 mg/L

Nota. Se muestran los promedios generales de los DQO obtenidos en los distintos tratamientos dentro del reactor MBBR. Para el lixiviado 1, según el promedio el tratamiento que genera mayor disminución de DQO es la Bioaumentación, no obstante, para el lixiviado 2 se determina que la Bioaumentación también es la mejor opción, pues muestra el valor de DQO más bajo entre todos los tratamientos.

Figura 20.

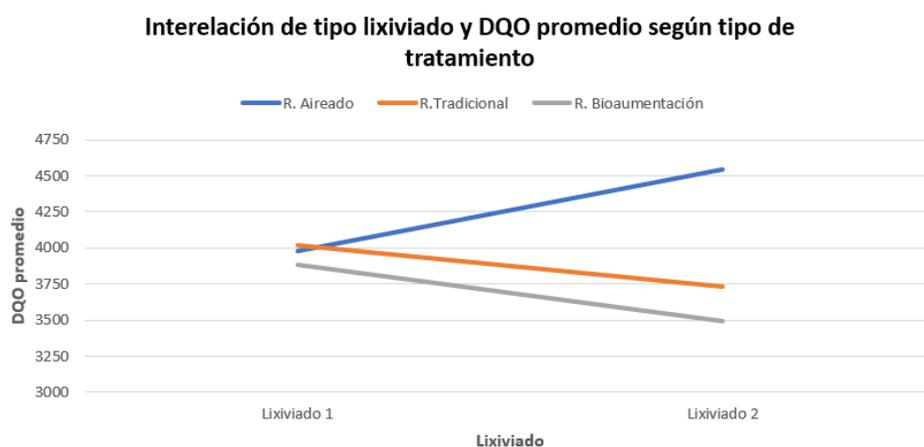
Gráfica de interacción DQO promedio y tipo de tratamiento.



Nota. Se observa las líneas de interacción del tipo de lixiviado: (azul) lixiviado 1 y (rojo) lixiviado 2, donde según el tratamiento y el DQO promedio, el mayor consumo de materia orgánica para la disminución de este parámetro se da con el lixiviado 2, cuando se realiza un reactor MBBR con bioaumentación.

Figura 21.

Gráfica de interacción DQO promedio y tipo de tratamiento.



Nota. Se observa las líneas de interacción del tipo de tratamiento: (azul) R. Aireado, (naranja) R. Tradicional y (gris) R. Bioaumentación, donde según el tipo de lixiviado y el DQO promedio, el

lixiviado 1 tiene menor disminución de DQO promedio en los 3 tipos de reactores, mientras que el lixiviado 2 genera mayor remoción de DQO promedio. También, el tratamiento solamente aireado presenta una línea ascendente, lo que significa que es el tratamiento menos eficaz de los 3, en comparación de los tratamientos tradicional y de bioaumentación, que tienen líneas descendentes casi paralelas en interacción positiva siendo mejores tratamientos que el aireado, sin embargo, el tratamiento de bioaumentación muestra una pendiente de disminución mayor y está por debajo de las otras rectas, entonces este se determina como el mejor tratamiento aplicado conjuntamente con el lixiviado 2.

Aplicando el Test de Duncan para el estudio de medias a través de tablas ANOVA se pudo determinar las diferencias y similitudes entre tipos de lixiviados (Tabla 22), el tiempo de tratamiento (Tabla 23), el tipo de tratamiento (Tabla 24) y la relación entre tipo de lixiviado y el tratamiento aplicado (Tabla 25) en cada reactor MBBR, dándonos así respaldo al diseño experimental para determinar el mejor tratamiento que en este caso resultó ser el uso del reactor MBBR con bioaumentación utilizando microorganismos nativos aplicados en el tratamiento del lixiviado 2 (P-9) (Figura 22).

Tabla 22.

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

Nota. Se muestra el análisis estadístico con Test de Duncan para los lixiviados con Alfa = 0.05, Error = 0.019 y gl= 15. Las medias que poseen la misma letra no presentan diferencias significativas ($p > 0.05$), lo que quiere decir que las características que diferencian el tipo de

lixiviado al ser de diferentes muestras no interfieren de manera significativa en el tipo de tratamiento que se les aplique.

Tabla 23.

Análisis estadístico con Test de Duncan aplicado al tiempo de tratamiento.

Tiempo	Medias	n	E.E.	
7	3385.83	6	123.45	A
5	3773.33	6	123.45	B
3	4023.33	6	123.45	B
0	4577.50	6	123.45	C

Nota. Se muestra el análisis estadístico con Test de Duncan para el tiempo de tratamiento con Alfa = 0.05, Error = 0.019 y gl= 15. Las medias que poseen la misma letra no presentan diferencias significativas ($p > 0.05$). Se caracteriza como C al peor tiempo de remoción, es decir el día 0, seguido de ello, para los días 3 y 5 no existe diferencia significativa entre ellos en la remoción de materia orgánica, pero si una mayor remoción que el día 0, por ello ambos presentan la letra B, y finalmente con la letra A se tiene al día 7 donde se logra la mayor remoción de DQO promedio en los tratamientos.

Tabla 24.

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

Nota. Se muestra el análisis estadístico con Test de Duncan para el tiempo de tratamiento con Alfa = 0.05, Error = 0.019 y gl= 15. Las medias que poseen la misma letra no presentan

diferencias significativas ($p > 0.05$). Según el tipo de tratamiento, el R. Aireado categorizado con B, es el peor método de remediación para el reactor MBBR, pues posee la media más alta de remoción de DQO. Mientras tanto, el R. Tradicional y el R. Bioaumentación, se categorizan con A y son los 2 mejores tratamientos para remediación, sin embargo, si se comparan las medias, a pesar de que estadísticamente no tienen una diferencia significativa, el mejor tratamiento entre ambos es el R. Bioaumentación con la media menor de DQO de entre los 3 tratamientos.

Tabla 25.

Análisis estadístico con Test de Duncan aplicado a la relación entre el tipo de lixiviado y el tratamiento aplicado.

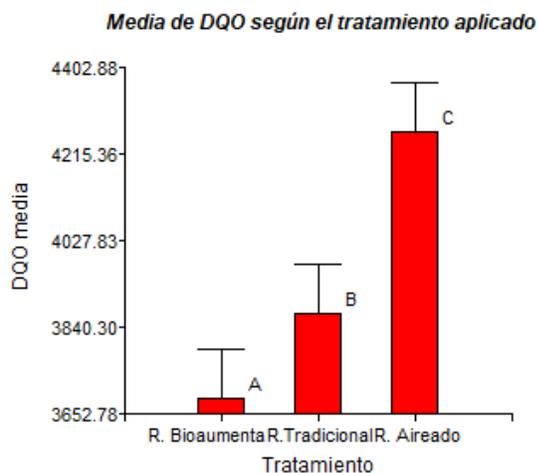
Lixiviado	Tratamiento	Medias	n	E.E.		
Lixiviado 2	R. Bioaumentación	3490.00	4	151.19	A	
Lixiviado 2	R. Tradicional	3727.50	4	151.19	A	B
Lixiviado 1	R. Bioaumentación	3883.75	4	151.19	A	B
Lixiviado 1	R. Aireado	3977.50	4	151.19	A	B
Lixiviado 1	R. Tradicional	4015.00	4	151.19		B
Lixiviado 2	R. Aireado	4546.25	4	151.19		C

Nota. Se muestra el análisis estadístico con Test de Duncan para el tiempo de tratamiento con Alfa = 0.05, Error = 0.019 y $gl = 15$. Las medias que poseen la misma letra no presentan diferencias significativas ($p > 0.05$). Se presenta la relación entre el lixiviado y el tipo de tratamiento, categorizando solamente como A, al mejor tratamiento que es R. Bioaumentación con el lixiviado 2, pues este es el que presenta la media de DQO más baja siendo el más eficiente. El tratamiento R. Tradicional, categorizado solamente como B, es el segundo mejor tratamiento, pero este aplicado en el lixiviado 1. Finalmente, categorizado como C, siendo el último tratamiento para elegir, tenemos el R. Aireado con lixiviado 1. Los tratamientos que

comparten A y B, son tratamientos que pueden ser tan o no tan buenos como los tratamientos categorizados con una sola letra.

Figura 22.

Gráfico de barras de tratamientos de lixiviados y disminución de DQO.



Nota. Se observa el gráfico de barras donde se detona la disminución de DQO media en cada tratamiento ($p > 0.05$), teniendo como A la disminución mayor siendo este en el Tratamiento con Bioaumentación, seguido de B, el Tratamiento Tradicional con un buen resultado de disminución, mientras que C, el Tratamiento solamente Aireado, tiene el valor más alto de DQO de entre los 3 tratamientos. Por ello, el mejor modelo para la biorremediación de lixiviados basados en la estadística es el tratamiento con Bioaumentación.

Después del análisis estadístico, resulta el rechazo de la hipótesis nula y se acoge la hipótesis alternativa donde el tratamiento aplicado en cada reactor y la degradación de materia orgánica (disminución de DQO) tienen al menos una diferencia significativa, durante el periodo de 7 días de tratamiento.

Capítulo V: Discusión

Como menciona Eljaike, M. (2013), los lixiviados son un problema latente alrededor del mundo, siendo uno de los retos más grandes para los profesionales en la rama ambiental, ya que estos residuos líquidos cuentan con elevadas cargas orgánicas. Por ello, en el estudio bibliográfico de Zafra-Mejía y Romero-Torres (2019), menciona que en Iberoamérica se han implementado varios tipos de tecnologías para tratar estos lixiviados, entre ellos y los más utilizados y reportados por las investigaciones son los procesos biológicos con un 34.1% de utilización para disminuir la contaminación ambiental, tanto de aguas y suelos, aguas fluviales y subterráneas, y con ello evitar afecciones directas a la salud pública.

En el estudio realizado, se utilizaron lixiviados, mismos que fueron fuente para la extracción de microorganismos y su posterior biorremediación. Al ser un tipo de agua residual con gran cantidad de contaminantes tanto orgánicos como inorgánicos, la mejor opción para remediar los lixiviados y disminuir su cantidad de carga orgánica fue la utilización de un tratamiento biológico, en este caso la bioaumentación de microorganismos nativos, ya que es una opción viable, económica y puede ser escalable de nivel laboratorio a nivel industrial para generar la reducción de la contaminación por estos residuos líquidos que se generan a diario.

La utilización de tratamientos biológicos como el sistema MBBR para el tratamiento de lixiviados, es una de las opciones de biorremediación más confiable, así lo menciona Canut A. *et al.* (2016), ya que es un proceso aerobio de biofilm con la utilización de carrier (chips plásticos) para crear una biopelícula o biomasa que permita la descomposición de la materia orgánica que se encuentra en las aguas residuales. La presencia de cada carrier aumenta de manera significativa la degradación de la materia orgánica, ya que dicha superficie les brinda protección a las bacterias y permite un alto crecimiento poblacional de los microorganismos, lo que ayuda a que no haya problemas con la presencia de altas cargas orgánicas, tiempo de retención hidráulica y formación de lodos.

Por las características que presenta el sistema MBBR, se logró escalar a nivel de laboratorio un sistema similar para buscar generar un gran crecimiento poblacional de microorganismos que puedan degradar la materia orgánica presente en los lixiviados, además de ser un sistema aerobio, fue complementado con una fuente de aireación para mantener el movimiento de los carrier (sorbetes) permitiendo así que las bacterias que se añadieron tengan mayor posibilidad de crecer y sobrevivir en el agua residual además de degradar toda la materia orgánica posible en el tiempo (7 días) en que se llevó a cabo el proceso.

Varios autores entre los que se encuentran Dupla *et al.* (2006); Rusten *et al.* (2006); y Plattes *et al.* (2007), mencionan las propiedades que definen y hacen eficiente a un sistema MBBR a comparación de otro tipo de sistemas biológicos de remediación. Entre sus menciones está la presencia de carrier lo que aumenta la superficie en la que los microorganismos pueden adherirse para poder tener un mayor crecimiento, además que permite la creación de biofilm dando mayor degradación a la materia orgánica presente en el lixiviado. La ventaja de este sistema es que presenta una concentración muy alta de biomasa, lo que permite que ocupe un menor volumen pero que mantenga su estabilidad. La eliminación de DBO5 y DQO es muy eficiente ya que estas tienen un porcentaje de remoción de 85-99% y de 24-85% respectivamente dentro de un sistema MBBR (Pozo-Zamora, 2009). Así también lo afirma Peitz y Xavier (2017), que al usar un tratamiento de MBBR para tratar aguas residuales mostro una eficiencia del 40% de remoción de DQO y un 92% de remoción de DBO5, afirmando estos porcentajes con una variabilidad de <3% en el estudio realizado por Vanzetto (2012) al utilizar el mismo sistema de remediación.

Se puede constatar la eficiencia del reactor tipo MBBR en la experimentación para tratar los lixiviados, qué a pesar de tener un corto periodo de tratamiento (7 días), se logró cuantificar la disminución de la carga orgánica inicial con la que se empezó el tratamiento. Los resultados arrojaron que para el lixiviado 1 (P1-2) con el sistema MBBR y bioaumentación (reactor C), se

obtuvo un porcentaje de disminución del DQO de 21.90%, mismo que podría ser considerado aceptable basado en los estudios y experimentaciones posteriormente mencionados. Sin embargo, en el lixiviado 2 (P9), con bioaumentación y sistema MBBR (reactor F), obtuvo una disminución del DQO de 44.66%, lo que demuestra la eficiencia del reactor, a pesar del corto tiempo y de ser una escala a laboratorio, este se encuentra dentro de los rangos que se han mostrado en estudios y en procesos aplicados a escala real.

Por otra parte, Kučić Grgić *et al.*, (2023) en su estudio, muestra que los microorganismos encontrados en los lixiviados que provienen de rellenos sanitarios son muy variados y adaptables a distintos ambientes, además de ser formadores de biopelículas, lo que les ayuda a degradar contaminantes de manera más eficaz. Afirmando lo mencionado, las bacterias encontradas en la experimentación luego de su aislamiento y caracterización fenotípica y genotípica son de vital importancia. Se determinó que la presencia de *Bacillus sonorensis* y *Bacillus licheniformis* en gran porcentaje en 2 de las muestras secuenciadas (aerobia y anóxica), mismas que fueron usadas posteriormente para caldos bacterianos y la bioaumentación, estos fueron claves para lograr la degradación de materia orgánica, ya que dichas bacterias tienen carácter remediador en aguas residuales y suelos, además de estar relacionadas entre sí (Palmisano *et al.*, 2001).

Makowski *et al.* (2021) indica que al caracterizar bioquímicamente a *Bacillus licheniformis*, es un bacilo Gram positivo, así como también arroja resultados positivos a la prueba de catalasa y que forma esporas. Así mismo, o Faraj Hamzah *et al.*, (2020) caracterizó a *Bacillus sonorensis*, siendo una bacteria en forma de bacilo y Gram positiva también con la capacidad de formar esporas. Estas características mencionadas en dichos estudios son coincidentes con la caracterización de las muestras que poseen a las cepas de *Bacillus* en este trabajo, además de demostrar que ambas especies de bacterias están relacionadas y ligadas

entre sí, al presentar colonias que pueden ser diferenciadas por su coloración, y por ser bacterias facultativas (Adimpong *et al.*, 2013).

En este caso, las bacterias encontradas para remediación de lixiviados como lo son *Bacillus sonorensis* y *Bacillus licheniformis*, son capaces de remediar otros tipos de contaminaciones por su capacidad de degradación y metabolismo de materia orgánica. Así, Muras *et al.* (2021), menciona que *Bacillus licheniformis* puede tener aplicaciones biotecnológicas como producción de combustibles, biofloculación y biorremediación de aguas y suelos. También, en otro estudio realizado por Oualha *et al.* (2019), probó que *Bacillus sonorensis* es capaz de degradar compuestos orgánicos como aceites e hidrocarburos, aumentando su solubilidad y con ello su biodegradabilidad.

Capítulo VI: 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 de donde se extrajeron las muestras clave, no fueron sometidos a ningún tratamiento previo, por ello se escaló a nivel de laboratorio biorreactores para ambientar las muestras tanto aerobia como anóxica, y posterior a esto lograr obtener las alícuotas correspondientes de cada reactor para el aislamiento de microorganismos nativos del lixiviado, esperando encontrar bacterias con propiedades facultativas.
- Mediante la aplicación de pruebas bioquímicas (tinción, pruebas reactivas y medios selectivos y diferenciales), se lograron determinar ciertas características fenotípicas de los microorganismos aislados de los diferentes reactores escalados (aerobio y anóxico), sin embargo, para una identificación en género y especie, fue necesaria una identificación genotípica, misma que se realizó mediante la tecnología Illumina y determinó la presencia de *Bacillus sonorensis* y *Bacillus licheniformis* en un alto porcentaje en dos de las tres muestras analizadas, mismas que mediante investigación bibliográfica se pudo determinar que poseen carácter remediador y son bacterias facultativas.
- La utilización de remediación mediante el uso de microorganismos (bioaumentación), es una de las alternativas ambientales más usadas, además de ser eficiente y de bajo costo. Uno de los sistemas de mayor utilidad y uso es el sistema MBBR, que permite una alta subsistencia a los microorganismos gracias a la aplicación de carrier donde se forma una biopelícula, y al ser un proceso aerobio, ayuda a generar una degradación más eficiente de los compuestos orgánicos contaminantes presentes en las aguas residuales.

- El tratamiento de los 2 lixiviados en un sistema MBBR, con bioaumentación de microorganismos nativos, después de 7 días y mediante el análisis del parámetro ambiental de DQO, determinó que la tasa de degradación para el lixiviado 1 (P1-2) fue del 21.90%, mientras que para el lixiviado 2 (P9) fue del 44.66%. Esta diferencia de porcentajes 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.

Capítulo VII: 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

Referencias Bibliográficas

- Adimpong, D. B., Sørensen, K. I., Dennis Sandris Nielsen, Thorsen, L., Trine Bernholdt Rasmussen, Derkx, P., y Jespersen, L. (2013). Draft Whole-Genome Sequence of *Bacillus sonorensis* Strain L12, a Source of Nonribosomal Lipopeptides. *Genome Announcements*, 1(2). <https://doi.org/10.1128/genomea.00097-13>
- Ahmadian, M., Yousefi, N., Van Ginkel, S.W., Zare, M.R., Rahimi, S., Fatehizadeh, A., (2012). Kinetic study of slaughterhouse wastewater treatment by electrocoagulation using Fe electrodes. *Water Sci. Technol*, 66(4), 754– 760.
- Álvarez, A., y Suárez, J. (2006). *Tratamiento Biológico del Lixiviado Generado en el Relleno Sanitario "El Guayabal" de la ciudad de San José de Cúcuta*. *Ingeniería y Desarrollo*, 95-105
- APHA (American Public Health Association), (1998). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 20th ed., Inc., Washington, D.C.
- APHA, AWWA y WPCF, (1992). *Métodos Normalizados para el análisis de aguas potables y residuales*. Madrid: Díaz de Santos.
- Baird, C. (2005). *Manual de Referencia Ambiental*. Medellín: Sapiens.
- Báez, J. (2008). *Ingeniería Ambiental, Sistema de Recolección y Evaluación de Aguas Residuales y Pluviales*. México: Dante.
- Banco Mundial, (2018). *Los desechos: un análisis actualizado del futuro de la gestión de los desechos sólidos. Informe What a Waste 2.0*. Obtenido de:
<https://www.bancomundial.org/es/news/immersive-story/2018/09/20/what-a-waste-an-updated-look-into-the-future-of-solid-waste-management>
- Bio-Rad. (2003). *Oxydase. Discos para hacer pruebas de la Oxidasa*. Obtenido de:
https://commerce.bio-rad.com/webroot/web/pdf/inserts/CDG/es/53832_11_2003_ES.pdf

- Bluegold. (2020). *Diferentes tipos de bacterias aplicadas al tratamiento de aguas residuales*. Blue Gold. <https://www.bluegold.es/es/el-papel-de-las-bacterias-dentro-del-tratamiento-biologico-de-aguas-residuales/>
- BossTech. (2019). *Tratamiento biológico de aguas residuales | BossTech Blog*. Obtenido de: <https://bosstech.pe/tratamiento-biologico-aguas-residuales/>
- BossTech. (2021). *¿Qué es un reactor MBBR y cómo funciona? | BossTech Blog*. Obtenido de: <https://bosstech.pe/que-es-tecnologia-mbbr/>
- Cando, C. (2021). *Estadística de Información Ambiental Económica en Gobiernos Autónomos Descentralizados Municipales*. Boletín técnico No 04-2020-GAD Municipales. Obtenido de https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/webinec/Encuestas_Ambientales/Municipios_2020/Residuos_solidos_2020/Boletin_Tecnico_Residuos_2020.pdf
- Canut, A., Duque, R., Donato, J. y Sáez, R. (2016). *Tecnología Moving Bed Biological Reactor (MBBR) para el tratamiento de aguas residuales de la industria Agroalimentaria*. Soluciones Industriales y Tratamientos Ambientales, S.L (SITRA). Scharlab. Obtenido de: https://sitra.es/wp-content/uploads/2021/11/Tecnologi%CC%81a_MBBR_industria_agroalimentaria_CTC_JUN_2016_0.pdf
- Delgado, A., Prieto, S., Amich, S. y Salvo, M. (1994). *Laboratorio de microbiología*. Nueva York: McGrawHill Interamericana.
- Dewisme, E. (1997). *Características de las aguas residuales*. En XV Curso sobre Tratamiento de Aguas Residuales y Explotación de Estaciones Depuradoras. CEDEX, Madrid.
- Dupla, M., Comeau, Y., Parent, S., Villemur, R., y Jolicoeur, M. (2006). *Design optimization of a self-cleaning moving-bed bioreactor for seawater denitrification*. *Water Research*, 40(2), 249–258. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.10.029>

- EMIS. (2023). Hidroambiental CIA Ltda Perfil de Compañía - Ecuador | Finanzas y ejecutivos clave. EMIS. https://www.emis.com/php/company-profile/EC/Hidroambiental_CIA_Ltda_es_3987012.html
- Eljaiek, M., Torres, L. y Bermúdez, W. (2013) "Alternativas de tratamiento de lixiviados aplicables al relleno sanitario parque ambiental Loma de los Cocos de la ciudad de Cartagena, Colombia". *Hacia un sistema de gestión integral de los residuos sólidos*, Cartagena: Redisa, pp. 1-6.
- Faraj Hamzah, A., Al-Tamimi, H., Saad, S., Mahdi, y Alameri, N. (2020). Isolation and identification new bacterial strains isolated from different sources of Al-Rafidiyah oil field in Iraq. *CATRINA*, 21(1), 15–22.
<https://faculty.uobasrah.edu.iq/uploads/publications/1610998363.pdf>
- Fernández, A., García, C., Sáez, J. y Valdezate, S., (2010). *Métodos de Identificación Bacteriana en el Laboratorio de Microbiología*. Procedimientos en Microbiología Clínica. Obtenido de:
<https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf>
- Giraldo, E. (2001). TRATAMIENTO DE LIXIVIADOS DE RELLENOS SANITARIOS: AVANCES RECIENTES. CORE. <https://doi.org/10.16924/riua.v0i14.538>
- Glynn H. y Heinke G, 1999. Ingeniería Ambiental. Residuos Sólidos. Prentice Hall, México. pp.600. Obtenido de: https://biblioasesorbogota.files.wordpress.com/2013/04/ingenieria-ambiental_glynn.pdf
- Gómez, M.A. (2010). *Ingeniería Sanitaria: Una panorámica. Ingeniería de aguas residuales vertidos y reutilización*. México: Árbol.
- González, R., Elizalde, B., Cortés, M. y Orduña, M. (2020). *Las tinciones básicas en el Laboratorio de Microbiología: Un enfoque gráfico*. UNAM, FES Zaragoza. Obtenido de: <https://www.zaragoza.unam.mx/wp-content/Portal2015/publicaciones/libros/cbiologicas/libros/Tinciones.pdf>

Google Maps. (2019). *Google Maps*.

<https://www.google.com/maps/search/biosequence+Av.+Checoslovaquia+E10-195+y+Eloy+Alfaro/@-0.1855012,-78.4788977,18z?authuser=0&entry=ttu>

Google Maps. (2019). *HIDROAMBIENTAL CIA Ltda*. Checoslovaquia E9-147, Edif. Bellagio.

<https://www.google.com/maps/search/Checoslovaquia+E9-147,+Edif.+Bellagio+/@-0.1844387,-78.4845222,15.92z?authuser=0&entry=ttu>

Henry, J.y Heinke,G. (1999). *Ingeniería Ambiental. Segunda Edición*. PRENTICE HALL,

México. Obtenido de:

https://www.academia.edu/10356057/Ingenieria_Ambiental_2_ED_J_Glynn_Henry_and_Gary_W_Heinke

Illumina (2010). Technology Spotlight: Illumina Sequencing. In *Highest data accuracy, simple workflow, and a broad range of applications*.

<https://www.illumina.com/documents/products/techspotlights/techspotlight.sequencing.pdf>

INEN (Instituto Ecuatoriano de Normalización, (2013). *Norma 2169: Agua. Calidad del agua.*

Muestreo. Manejo y Conservación de Muestras.

Koneman E., Allen S., Janda W., Schreckenberger P., Winn W. y Procop G (2003) *Diagnóstico microbiológico: Texto y atlas color*. 5ª ed. Buenos Aires: Médica Panamericana.

Kučić Grgić, D., Miloloža, M., Vesna Ocelić Bulatović, Šime Ukić, Miroslav Šlouf, & Gajdosova, V. (2023). Screening the Efficacy of a Microbial Consortium of Bacteria and Fungi Isolated from Different Environmental Samples for the Degradation of LDPE/TPS Films.

Separations, 10(2), 79–79. <https://doi.org/10.3390/separations10020079>

La Hora, (2021). *Quito tiene 150.000 metros cúbicos de lixiviados acumulados*. Quito. Obtenido de <https://www.lahora.com.ec/pais/quito-tiene-150-000-metros-cubicos-de-lixivadosacumulados/>

MacCONKEY, A.T. (1905) Lactose-fermenting Bacteria in faeces. J. Hyg 5:333.

MacFaddin, J. F. (2003). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Médica Panamericana

Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, P. V., y Clark, D. P. (2009). Brock biología de los microorganismos. España: Person Educación, S.A. Obtenido de <https://pearson.es/espa%C3%B1a/TiendaOnline/brock-biolog%C3%ADa-de-los-microorganismos>

Makowski, K., Leszczewicz, M., Broncel, N., Lipinska-Zubrycka, L., Głębski, A., Komorowski, P. y Walkowiak, B. (2021). Aislamiento, caracterización bioquímica e identificación de *Paenibacillus lactis* y *Bacillus licheniformis* termotolerantes y celulolíticos. PubMed. <https://doi.org/10.17113/ftb.59.03.21.7096>

Manahan, S. (2007). *Tratamiento de Aguas*. México: Reverte.

Matia, L., Martín, J., Ventura, F. y Campos, C. (1999). La qualitat dels recursos no convencionals. En Xarxa Temàtica: Recursos d'aigua. (eds. M. Salgot, X. Sánchez y A. Torrens). Fundació Agbar.

Méndez-Novelo, R., Castillo-Borges, E., Sauri-Riancho, M. R., Quintal-Franco, C., Giacomani-Vallejos, G., y Jiménez-Mejía, B. (2004). Tratamiento fisicoquímico de los lixiviados de un relleno sanitario. Ingeniería, 8(2), 155-163. <https://www.redalyc.org/pdf/467/46780213.pdf>

Metcalf y Eddy. (1996). Ingeniería de aguas residuales tratamiento, vertido y reutilización. Madrid: Impresos y Revistas S. A. Obtenido de https://www.academia.edu/45529169/Ingenieria_de_aguas_residuales_tratamiento_vertido_y_reutilizacion_Volumen_II_Metcalf_y_Eddie

- Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica, 2018. *Texto Unificado de Legislación Secundaria de Medio Ambiente*. Anexo 2. pp 283. Obtenido de:
<https://www.ambiente.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2018/05/TULSMA.pdf>
- Milan, R., (2003). *Tratamientos de Aguas Residuales*. Madrid: CEM.
- Mujeriego, R. (1990). *Manual Práctico de Riego con Agua Residual Municipal Regenerada*, Generalitat de Catalunya y Universitat Politècnica de Catalunya. Barcelona-España
- Muñoz, A. (2005). *Depuración de Aguas Residuales*. Medellín: Paraninfo.
- Muras, A., Romero, M., Mayer, C., & Otero, A. (2021). *Biotechnological applications of Bacillus licheniformis*. *Critical Reviews in Biotechnology*, 41(4), 609–627.
<https://doi.org/10.1080/07388551.2021.1873239>
- Ocampo, M., Lodoño, A., Giraldo, G. y Sanabria, N., (2017). *Remoción de mercurio en lixiviados de un relleno sanitario empleando carbón activado impregnado con azufre*. *Producción más Limpia*. Vol. 12, Nº1 -41-48. DOI:10.22507/pml.v12n1a4
- Orozco, (2018). *Determinación de lixiviados de relleno Sanitario de San Ramón y selección del sistema de tratamiento*. Tecnológico de Costa Rica
- Oualha, M., Al-Kaabi, N., Al-Ghouti, M., Zouari, N. (2019). *Identification and overcome of limitations of weathered oil hydrocarbons bioremediation by an adapted Bacillus sonorensis strain*. *Journal of Environmental Management*.
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109455>.
- Palmisano, M. M., Nakamura, L. K., Duncan, K. E., Istock, C. A., y Cohan, F. M. (2001). *Bacillus sonorensis* sp. nov., a close relative of *Bacillus licheniformis*, isolated from soil in the Sonoran Desert, Arizona. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(5), 1671–1679. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-5-1671>
- Peitz, C. y Xavier, C. (2017). *Tratamiento de efluente Kraft contendo fitoesteróis por reator de leito móvil MBBR*. INTERCIENCIA. Vol. 42-8. Obtenido de:
<https://www.interciencia.net/wp-content/uploads/2017/08/536.pdf>

- Pérez-Pérez, J. (2018). *Protocolo de lavado y esterilización de material en autoclave semiautomatizado*. Sello Editorial Tecnológico de Antioquia.
- Plattes M., Fiorelli, D., Gillé, S., Girard, C., Henry, E., Minette, F., O’Nagy, O. y Schosseler, P. (2007). Modelling and dynamic simulation of a moving bed bioreactor using respirometry for the estimation of kinetic parameters. *Biochemical Engineering Journal*, 33(3), 253–259. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2006.11.006>
- Pozo-Zamora, G. (2009). *Optimización de la Operación de un Reactor Aeróbico de Biopelícula Bacteriana Inmovilizada: Incidencia de los Nutrientes en la Biosíntesis de Polihidroxicanoato (PHA) Como Producto del Tratamiento de Efluentes de Celulosa KRAFT*. (Tesis de Maestría). Universidad de Concepción, Concepción
- Prescott, L., Harley, J. y Klein, D. (2004). *Microbiología*. 5a ed. Madrid: McGraw-Hill Interamericana.
- ReactLab. (2022). *Procedimiento práctico para realizar diluciones ¿Qué es una dilución? Tipo de diluciones*. <https://reactlab.com.ec/wp-content/uploads/2022/04/Proceso-Dilucion-B12-1.pdf>
- Rodríguez, C. y Zhurbenko R. (2018). *BioCen: Manual de Medios de Cultivo 2018. Agar Eosina Azul de Metileno*. Cuarta Edición. Cuba.pp.41. *Obtenido de:* <https://www.biocen.cu/wp-content/uploads/2021/05/Manual-MC-2018.pdf>
- Rodríguez, C. & Zhurbenko R. (2018). *BioCen: Manual de Medios de Cultivo 2018. Agar Nutritivo*. Cuarta Edición. Cuba.pp.50. *Obtenido de:* <https://www.biocen.cu/wp-content/uploads/2021/05/Manual-MC-2018.pdf>
- Rodríguez, M., (2005). *El Agua*. (P. d. Aguas, Trad.). Madrid: Efase.
- Rodríguez, P. & Arenas, R. (2018). *Hans Christian Gram y su tinción. Hans Christian Gram and His Staining*. *Obtenido de:* <https://www.medigraphic.com/pdfs/cosmetica/dcm-2018/dcm182n.pdf>

- Rusten, B., Bjørnar Eikebrokk, Yngve Ulgenes, y Eivind Lygren. (2006). *Design and operations of the Kaldnes moving bed biofilm reactors. Aquacultural Engineering*, 34(3), 322–331.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2005.04.002>
- Scharlau Microbiología, (2023). *MacCONKEY AGAR (Eur. Pharm). Ficha Técnica*. 064-PA0019.
- Scragg, A. (1999). *Tratamiento de Aguas Residuales*. México: Reverte.
- Seoanez, M. (2003). *Manual de Tratamiento, Reciclado, Aprovechamiento y Gestión de Aguas Residuales de las industrias Agroalimentarias*. Ediciones Paraninfo S.A. Madrid (España)
- Spiro, T. (2004). *Contaminación del Agua y Procesos de Tratamiento*. México: Cengage Learning.
- Torske, M. (2019). *La realidad de las aguas servidas en Ecuador – YAKUNINA*. Yakunina.com.
<https://www.yakunina.com/la-realidad-de-las-aguas-servidas-en-ecuador/#:~:text=En%20Ecuador%20aproximadamente%20se%20trata,apta%20para%20el%20consumo%20humano>.
- Valderrama, J., Ortigosa, F. y Cañas, R. (2020). *Métodos de Secuenciación: Tercera Generación*. Encuentros en la Biología. Vol. XIII. Obtenido de:
https://encuentros.uma.es/assets/journals/13/175singles/175.4_secuenciacion.pdf
- Van der Maarel, M., Van der Veen, B., Uitdehaag H., Leemhuis, H. y Dijkhuizen, L (2002). *Properties and applications of starch converting enzymes of the amylase family*. *Journal Biotechnol.* 94:137-55
- Vanzetto, S. (2012). *Estudos de viabilidade de tratamento de efluente de indústria de celulose kraft por reator biológico com leito móvel (MBBR)*. Tese. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Brasil. 53 pp.
- WWAP (Programa Mundial de Evaluación de los Recursos Hídricos de las Naciones Unidas). 2017. Informe Mundial de las Naciones Unidas sobre el Desarrollo de los Recursos Hídricos 2017. Aguas residuales: El recurso desaprovechado. París, UNESCO

Zafra-Mejía, C. y Romero-Torres, D., (2019). Tendencias tecnológicas de depuración de lixiviados en rellenos sanitarios iberoamericanos. *Revista Ingenierías Universidad de Medellín*, 18(35), 125–147. <https://doi.org/10.22395/rium.v18n35a8>