

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS - ESPE

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**COMPARACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS
PRESENTES EN EL INÓCULO I5-ESPE ANTES Y
DESPUÉS DEL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES
TEXTILES EN CONDICIONES AEROBIAS, MEDIANTE
PRUEBAS MORFOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS.**

**PREVIO A LA OBTENCIÓN DE GRADO ACADÉMICO O
TÍTULO DE:**

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

ELABORADO POR:

RENATA ABIGAIL MONTERO CALDERÓN

SANGOLQUÍ, SEPTIEMBRE 2013

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue realizado en su totalidad por la Srta. RENATA ABIGAIL MONTERO CALDERÓN como requerimiento parcial a la obtención del título de INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA.

Sangolquí, septiembre 2013.

Alma Koch, MC.
DIRECTORA

Ing. Mat. Pedro Romero
CODIRECTOR

REVISADO POR
Ing. Tatiana Páez, MC.
COORDINADORA DE LA CARRERA

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

RENATA ABIGAIL MONTERO

Declaro que:

El proyecto de grado denominado COMPARACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS PRESENTES EN EL INÓCULO I5-ESPE ANTES Y DESPUÉS DEL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES TEXTILES EN CONDICIONES AEROBIAS, MEDIANTE PRUEBAS MORFOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS, ha sido desarrollado en base a una investigación exhaustiva, respetando los derechos intelectuales de terceros, conforme a las citas que constan en el texto cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de mi autoría.

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

Sangolquí, septiembre 2013.

AUTORIZACIÓN

RENATA ABIGAIL MONTERO

Autorizo que:

El proyecto de grado denominado COMPARACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS PRESENTES EN EL INÓCULO I5-ESPE ANTES Y DESPUÉS DEL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES TEXTILES EN CONDICIONES AEROBIAS, MEDIANTE PRUEBAS MORFOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS; sea publicado en la biblioteca virtual de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE.

Sangolquí, septiembre 2013.

DEDICATORIA

A Sarita, Silvio, Carolina, Xavier, Alegría y su madre.

Renata Abigail Montero Calderón

AGRADECIMIENTOS

A Dios, mis padres y hermanos por su amor incondicional.

A Alma Koch, MC. por ser un ejemplo de profesionalismo y un ser humano inmejorable.

Al Ing. Pedro Romero por su respaldo y preciado conocimiento aportado al proyecto.

A Esteban, Silvana, Paúl, Crisol S., Cristy C. y JuanFra I. por convertirse en personas extremadamente valiosas en mi vida.

A mis queridos amigos y amigas, gracias.

Renata Abigail Montero Calderón

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CERTIFICACIÓN	ii
DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD	iii
AUTORIZACIÓN	iv
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTOS	vi
ÍNDICE DE CONTENIDOS	vii
LISTADO DE TABLAS	ix
LISTADO DE FIGURAS	x
LISTADO DE ANEXOS	xi
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiii
CAPÍTULO 1	1
1.1. Formulación del problema	1
1.2. Justificación del problema	3
1.3. Objetivos de la investigación	4
1.3. Objetivo general	4
1.3.2. Objetivos específicos	4
1.4. Marco teórico	5
1.4.1. Contaminantes del efluente textil	5
1.4.2. Tratamiento de agua residual textil	6
1.4.3. Microorganismos en la remoción de contaminantes textiles	8
1.4.4. Caracterización de un consorcio microbiano	10
1.4.4.1. Inóculo microbiano	10
1.4.4.2. Métodos de identificación	11
1.5. Hipótesis de investigación	13
CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS	14
2.1. Participantes	14
2.2. Zona de estudio	14
2.3. Período de tiempo de investigación	14
2.4. Procedimiento	14

2.4.1. Activación del inóculo	14
2.4.2. Aislamiento de colonias	16
2.4.3. Evaluación macroscópica	17
2.4.4. Descripción morfológica celular	18
2.4.5. Análisis bioquímico	18
2.4.6. Análisis confirmatorio	19
2.5. Análisis estadístico	19
CAPÍTULO 3: RESULTADOS	20
3.1. Activación del inóculo	20
3.2. Aislamiento de colonias	21
3.3. Evaluación macroscópica	23
3.4. Descripción morfológica celular	24
3.5. Análisis bioquímico	26
3.6. Análisis confirmatorio	28
3.7. Análisis estadístico	28
CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN	31
4.1. Activación del inóculo	31
4.2. Aislamiento de colonias	32
4.3. Evaluación macroscópica y morfológica celular	33
4.4. Análisis bioquímico y confirmatorio	34
4.5. Comparación del inóculo I5 antes y después del tratamiento de aguas residuales textiles en condiciones aerobias	37
CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES	43
CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES	45
CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA	46
CAPÍTULO 8: ANEXOS.....	54

LISTADO DE TABLAS

- Tabla 1.1:** Valores a considerar en las descargas de aguas residuales textiles hacia el alcantarillado público o a un cuerpo de agua dulce, según el TULAS. FUENTE: Secretaría de Ambiente, (2010)..... 8
- Tabla 2.1:** Soluciones madre del medio de cultivo mineral empleado para la activación del inóculo I5. FUENTE: Moncayo y Ayala (2010).. 15

LISTADO DE FIGURAS

Figura 3.1:	Inóculo I5-ESPE proporcionado por el cepario de Microbiología Ambiental – CEINCI (a) original, (b) luego del tratamiento; e inóculo activado (c) original, (d) luego del tratamiento. FUENTE: Montero (2013).....	20
Figura 3.2:	Número de colonias aisladas en el inóculo I5-ESPE antes y después del tratamiento de aguas residuales textiles (TART). FUENTE: Montero (2013).....	21
Figura 3.3:	Aislamiento de colonias microbianas del inóculo I5 luego de 48 h en (a) medio PDA, (b) Agar Manitol Salado; y (c) PDA luego de 21 días para hongos filamentosos. FUENTE: Montero (2013).....	22
Figura 3.4:	Porcentaje de las colonias aisladas del inóculo I5 considerando diversos criterios de evaluación macroscópica. FUENTE: Montero (2013).	23
Figura 3.5:	Morfología celular de las colonias aisladas del inóculo I5, luego de la tinción Gram. FUENTE: Montero (2013).....	24
Figura 3.6:	Descripción morfológica celular de colonias aisladas del inóculo: (a) levaduras, (b) bacilos gramnegativos, (c) bacilos grampositivos esporulados y (d) estafilococos. FUENTE: Montero (2013).	25
Figura 3.7:	Especies microbianas presentes en el inóculo I5-ESPE antes (A-TART) y después (D-TART) del tratamiento de aguas residuales textiles. FUENTE: Montero (2013).	26
Figura 3.8:	Pruebas bioquímicas efectuadas a las colonias aisladas del inóculo I5 (a) hidrólisis del almidón, (b) hidrólisis de la urea, (c) fermentación de azúcares, con formación de ácido y (d) auxonograma. FUENTE: Montero (2013).	27
Figura 3.9:	Tabla de contingencia y comparación estadística de los inóculos I5 antes (A-TART) y después (D-TART) del tratamiento de aguas residuales, mediante la asistencia del programa InfoStat. FUENTE: Montero (2013).....	29
Figura 3.10:	Índice de Jaccard e índice de Dice-Sorensen para la comparación del inóculo I5 antes y después del tratamiento de aguas, mediante la asistencia del programa InfoStat. FUENTE: Montero (2013).	30

LISTADO DE ANEXOS

ANEXO A:	Algoritmo de identificación de bacilos gramnegativos (Universidad de Idaho, 2012).	54
ANEXO B:	Algoritmo de identificación de enterobacterias lactosa positivas (Universidad de Idaho, 2012).	55
ANEXO C:	Algoritmo de identificación de enterobacterias lactosa negativas (Universidad de Idaho, 2012).	56
ANEXO D:	Algoritmo de identificación de bacilos grampositivos (Universidad de Idaho, 2012).	57
ANEXO E:	Algoritmo de identificación de <i>Bacillus</i> spp. (Universidad de Idaho, 2012).	58
ANEXO F:	Algoritmo de identificación de cocos grampositivos (Universidad de Idaho, 2012).	59
ANEXO G:	Algoritmo de diferenciación de hongos levaduriformes (Ministerio de Salud Pública del Perú, 2007).	60
ANEXO H:	Identificación de especies de <i>Candida</i> (Macola, 2010).	61
ANEXO I:	Diferenciación de especies comunes de <i>Saccharomyces</i> , <i>Kluyveromyces</i> y <i>Zygosaccharomyces</i> (Harrigan, 1998).	62
ANEXO J:	Pruebas bioquímicas efectuadas a las colonias de bacilos gramnegativos aislados del inóculo I5-ESPE (Montero, 2013).	63
ANEXO K:	Pruebas bioquímicas efectuadas a las colonias de bacilos grampositivos aislados del inóculo I5-ESPE (Montero, 2013).	63
ANEXO L:	Pruebas bioquímicas efectuadas a la colonia de estafilococos aislados del inóculo I5-ESPE (Montero, 2013).	64
ANEXO M:	Pruebas bioquímicas efectuadas a las colonias de levaduras aisladas del inóculo I5-ESPE (Montero, 2013)	65
ANEXO N:	Confirmación de especies bacterianas <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>Staphylococcus xylosus</i> y de hongos levaduriformes <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y <i>Candida tropicalis</i> ; como resultado del empleo del sistema API® (Montero, 2013).	66

RESUMEN

En la investigación se comparó los microorganismos presentes en el inóculo I5-ESPE antes y después del tratamiento de aguas residuales textiles en condiciones aerobias, pues en investigaciones previas, el inóculo I5 ha demostrado ser eficaz en la disminución de contaminantes propios de la industria textil. Los inóculos antes y después del tratamiento fueron proporcionados por el cepario del laboratorio de Microbiología Ambiental del CEINCI-ESPE. Luego de su activación, se obtuvieron cultivos puros y se determinaron sus características macroscópicas y microscópicas. Después, se identificaron las especies microbianas mediante pruebas bioquímicas y un análisis confirmatorio con el sistema API®. Las especies encontradas en el inóculo I5-ESPE antes del tratamiento de aguas residuales fueron *Staphylococcus xylosus*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida tropicalis*; las especies exclusivas del inóculo I5 después del tratamiento de aguas residuales textiles en condiciones aerobias fueron *Enterobacter cloacae* y *Bacillus megaterium*; la especie común encontrada fue *Bacillus subtilis*; además, ningún inóculo presentó especies de hongos filamentosos. En la investigación se constata que existe disimilitud y un bajo índice de especies comunes entre el inóculo I5-ESPE antes y después del tratamiento de aguas residuales textiles.

ABSTRACT

This research compared the microorganisms presents in I5-ESPE inoculum before and after made an treatment to textile wastewater at aerobic conditions, because in previous investigations, the inoculum was effective to reduce textile industry's pollutants. The inoculums before and after treatment were supplied by the Environmental Microbiology Laboratory of the CEINCI-ESPE. Later their activation, pure cultures were isolated and examined their macroscopic and microscopic characteristics. Next, the microbial species were characterized using biochemical tests and API® system for confirmatory analysis. The species found in I5 inoculum before wastewater treatment were *Staphylococcus xylosus*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida tropicalis*; the species from I5 inoculum after textile wastewater treatment at aerobic conditions were *Enterobacter cloacae* and *Bacillus megaterium*; a common specie found in the inoculums was *Bacillus subtilis*. Furthermore, there was not filamentous fungi on any inoculums. This research affirm that exist dissimilarity and a low index of common species between I5-ESPE inoculum before and after a textile wastewater treatment.

CAPÍTULO 1

“COMPARACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS PRESENTES EN EL INÓCULO I5-ESPE ANTES Y DESPUÉS DEL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES TEXTILES EN CONDICIONES AEROBIAS, MEDIANTE PRUEBAS MORFOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS”.

1.1. Formulación del problema

El crecimiento poblacional y su tendencia a la modernización han contribuido al progreso de la industria textil (Butani *et al.*, 2013). Hasta finales del 2012, el sector textil e indumentario tuvo una tasa de crecimiento del 7%, dentro del comercio mundial (OMC, 2013).

En el Ecuador, los inicios de la industria textil datan del siglo XVII, cuando se comenzaron a realizar tejidos con lana de oveja. Desde entonces, tal industria ha progresado en el país, llegando a ser el segundo sector manufacturero que más mano de obra emplea (AITE, 2012). Sin embargo, así como ha incrementado la industria en el país y el mundo, han aumentado sus desechos.

Así, el desafío de la industria es mantener el crecimiento económico y a su vez, precautelar el medio ambiente (Bur, 2013). Por ello, surge la necesidad de encontrar soluciones a los problemas ambientales

que las empresas textiles ocasionan; una alternativa es la biorremediación de los efluentes generados.

En la búsqueda de un tratamiento biológico a las aguas residuales de empresas textiles, Moncayo (2010) seleccionó un inóculo microbiano denominado I5, capaz de remover los colorantes reactivos textiles: Azul navy 171, rojo 141 y amarillo 84 en un 75.56%, 79.16% y 89.73%, respectivamente.

A partir de ello, el inóculo I5 fue empleado en otras investigaciones: disminución de concentración de fenol en agua sintética (Montenegro, 2010); biorremoción de cromo total y cromo VI a escala de laboratorio (Guevara, 2010); remoción de zinc en agua sintética (García, 2011) y biodegradación de tensoactivos aniónicos (Paladines, 2011). Se construyó una planta piloto para el tratamiento de aguas residuales textiles (Muñoz, 2011) y se probó la efectividad del inóculo en condiciones aerobias (Rivadeneira, 2013).

Pese a que en investigaciones previas el inóculo I5 ha demostrado ser eficaz en la disminución de contaminantes propios de la industria textil, aún no se ha comparado a los microorganismos que conforman el inóculo antes y después del tratamiento de aguas residuales textiles, por lo que resulta necesario caracterizarlo morfológica y bioquímicamente para maximizar sus beneficios.

1.2. Justificación del problema

La comparación microbiana del inóculo I5 permite identificar el cambio en la composición del consorcio. En la investigación de Travis, Burce & Rosser (2008) se muestra que solo pocos microorganismos de un consorcio original, sobreviven a las nuevas condiciones ambientales generadas en una experimentación. Estudios de Wertz *et al.* (2007) y Allison & Martiny (2008) resaltan que la capacidad de un consorcio para resistir al cambio, así como el tiempo para establecer su composición original, dependen directamente de las alteraciones a las que es sometido el cultivo microbiano.

Igualmente, la identificación y comparación del inóculo I5, favorece la reproducibilidad de las investigaciones afines al tratamiento de aguas residuales textiles; pues como señalan Pearce, Lloyd & Guthrie (2003), aunque los inóculos compuestos brindan una evaluación macroscópica de lo que ocurre en un sistema de estudio, sus resultados no son fácilmente reproducibles en el laboratorio. Por ello, se sugiere su reproducibilidad mediante inóculos puros.

Finalmente, ya que en Ecuador son escasos los estudios enfocados al tratamiento de agua residual textil mediante consorcios microbianos, la presente investigación se orienta a comparar los microorganismos de un inóculo, evaluado en estudios previos como eficaz en la remoción de contaminantes propios de los efluentes textiles; esto

con la finalidad de contribuir con el proyecto “Obtención de un inóculo bacteriano nativo capaz de degradar compuestos contaminantes típicos en efluentes de industrias textiles para que sea utilizado como biomasa en plantas de tratamiento biológico de aguas residuales a escala real” iniciado en el año 2009, en beneficio de la remediación biológica y preservación del agua.

1.3. Objetivos de la investigación

1.3.1. Objetivo general

Comparar los microorganismos presentes en el inóculo I5-ESPE antes y después del tratamiento de aguas residuales textiles en condiciones aerobias, mediante pruebas morfológicas y bioquímicas.

1.3.2. Objetivos específicos

- Activar el inóculo I5 original y el inóculo obtenido luego del tratamiento de aguas residuales textiles en condiciones aerobias.
- Aislar las colonias aerobias mesófilas con 48 horas de incubación (bacterias y hongos levaduriformes) o 7 días (hongos filamentosos), hasta obtener cultivos puros.
- Determinar las características del cultivo: morfología, color y tinción.

- Identificar los cultivos puros mediante pruebas bioquímicas tratadas en base a claves bibliográficas.
- Comparar los microorganismos identificados en el inóculo I5 antes y después del tratamiento de aguas residuales textiles en condiciones aerobias.

1.4. Marco teórico

1.4.1. Contaminantes del efluente textil

Para comprender el efluente textil, es necesario señalar los procesos abarcados en la fabricación de tejidos. Se empieza con la generación de fibras que pueden ser artificiales (si provienen de celulosa) y sintéticas (si proceden del petróleo). Las fibras en bruto, pasan al lavado y peinado hasta lograr: eliminación de impurezas para mejorar la calidad del hilo, disposición del hilo en cintas, afinado y refinamiento del hilo hasta que tenga características homogéneas en cuanto a su resistencia y tamaño. Estas fases de preparación y blanqueo de las fibras utilizan agua, por lo que los efluentes contendrán: polvo, aceites, aditivos, detergentes, clorito sódico, peróxido de hidrógeno e incluso pesticidas (ATEXGA, 2008; Walters, Santillo & Johnston, 2005).

A las anteriores fases le sigue el teñido del hilado, que se realiza por disolución de combinaciones colorantes azobenceno y cuerpos amino-azo u otros colorantes reactivos. Posteriormente está la etapa de tisado para la obtención de tejidos a partir del hilo elaborado. La fase comienza con el enlazamiento de los hilos y termina con las impresiones, estampados y acabados del tejido (ATEXGA, 2008).

Por los procesos previamente mencionados, las aguas residuales textiles contienen gran cantidad de sustancias inorgánicas reveladas en altos valores de demanda química de oxígeno ($150 - 12000 \text{ mg.L}^{-1}$), colorantes reactivos, pH básico, sólidos suspendidos ($15 \text{ a } 8000 \text{ mg.L}^{-1}$), sólidos disueltos ($2900 \text{ a } 3100 \text{ mg.L}^{-1}$), cloruros ($1000 \text{ a } 1600 \text{ mg.L}^{-1}$) y demanda bioquímica de oxígeno ($80 \text{ a } 6000 \text{ mg.L}^{-1}$). Además, se debe considerar que en las fases de tintura y estampado pueden descargarse contaminantes como: cromo, cobre y zinc (Al-Kdasi *et al.*, 2004; Pertiwi & Roosmini, 2010).

1.4.2. Tratamiento de agua residual textil

El mayor indicativo de la contaminación en aguas residuales textiles es la presencia de colorantes y su eliminación continúa siendo el principal problema del tratamiento de los efluentes. Los colorantes más empleados en la industria son aquellos que contienen un grupo azo ($\text{N}=\text{N}$) y aunque presentan buenos resultados en la fabricación de los tejidos, pueden transformarse en aminas aromáticas, componentes

potencialmente cancerígenos para los organismos vivos (Khadijah, Lee & Mohd, 2009).

Para el tratamiento de los efluentes textiles se emplean métodos físico-químicos como: coagulación y floculación, flotación por aire disuelto, desecamiento de lodos y ósmosis inversa. Estos tratamientos presentan eficacia al momento de reducir los contaminantes, sin embargo, son costosos y requieren de otros químicos para su ejecución (Salas, 2003).

También existe el tratamiento biológico de aguas residuales, que en diversas industrias, ha garantizado buenos resultados. Su uso se ha potenciado por la efectividad y porque emplea métodos amigables con el ambiente. En la industria textil, la atención se centra en la capacidad de bacterias y hongos para remover los colorantes tipo azo; igualmente, presentan procesos evolucionarios de adaptación continua para la decoloración, parámetro que los procesos físico-químicos no pueden lograr (Kandelbauer & Guebitz, 2005; Khadijah, Lee & Mohd, 2009).

En el Ecuador, el Texto Unificado de Legislación Ambiental Secundaria del Ministerio de Ambiente (TULAS), contiene los parámetros para la regulación de la descarga de efluentes. En el Libro VI – Anexo 1 se señalan los límites de descarga de aguas residuales al sistema de alcantarillado público y a un cuerpo de agua dulce. En la tabla 1.1 se señalan varios valores a considerar en las aguas residuales textiles (Secretaría de Ambiente, 2010).

Tabla 1.1: Valores a considerar en las descargas de aguas residuales textiles hacia el alcantarillado público o a un cuerpo de agua dulce, según el TULAS. FUENTE: Secretaría de Ambiente (2010).

Parámetros	Expresado como	Unidad	Límite máximo permisible
Cobre	Cu	mg.L ⁻¹	1.0
Cromo hexavalente	Cr ⁺⁶	mg.L ⁻¹	0.5
Color real	Color real	unidades de color	inapreciable en dilución 1/20
Potencial hidrógeno	pH		5-9
Demanda bioquímica de oxígeno (5 días)- alcantarillado	DBO ₅	mg.L ⁻¹	250
Demanda bioquímica de oxígeno (5 días)- cuerpo de agua dulce	DBO ₅	mg.L ⁻¹	100
Demanda química de oxígeno- alcantarillado	DQO	mg.L ⁻¹	500
Demanda química de oxígeno- cuerpo de agua dulce	DQO	mg.L ⁻¹	250
Sulfuros-alcantarillado	S	mg.L ⁻¹	1.0
Sulfuros-alcantarillado	S	mg.L ⁻¹	0.5

1.4.3. Microorganismos en la remoción de contaminantes textiles

Dos grupos de microorganismos: bacterias y hongos, han sido los más estudiados en el tratamiento de aguas residuales textiles. Esto debido a su eficacia en la remoción de contaminantes y porque permiten la transformación de los colorantes en compuestos como dióxido de carbono, agua y lodo no perjudicial al ambiente (Rai *et al.*, 2005).

La remoción de residuos lignocelulósicos, colorantes y varios compuestos químicos por acción de los hongos, se adjudica a que poseen

enzimas oxidativas tales como la Lignina Peroxidasa, Manganese Peroxidasa y lacasas. Igualmente, las bacterias logran la sulfato reducción y mineralización de los colorantes en condiciones aerobias e incluso, consiguen la decolorización del efluente, más rápido que los hongos (Butani *et al.*, 2013).

A partir de los 70s, comenzó el interés por aislar microorganismos capaces de remover colorantes textiles en agua residual, reportándose como el primero a *Bacillus subtilis*. Desde entonces, se han identificado gran variedad de microorganismos para el mismo fin: *Bacillus megaterium*, *Alcaligenes faecalis*, *Rhodococcus erythropolis*, *Bacillus licheniformis*, entre otros (Butani *et al.*, 2013).

Olukanni, Osuntoki & Gbenle (2006) identificaron 24 cepas bacterianas pertenecientes a los géneros: *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Legionella* y *Pseudomonas*, en el tratamiento de un efluente textil en Lagos – Nigeria.

En Tirupur, una reconocida región textilera de la India, se identificó que *Bacillus sp.*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas fluorescens* son especies bacterianas eficientes en la remoción del colorante textil naranja 3R y también colaboran en la reducción de otros colorantes tipo azo como: Amarillo GR, azul T y negro RL (Manivannan, Reetha & Ganesh, 2011).

Igualmente, se ha identificado que microorganismos como: *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacterioides fragilis*, *Peptostreptococcus*,

Clostridium perfringens, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, contribuyen en el tratamiento de aguas residuales textiles, principalmente en la reducción de colorante azul índigo (Ajibola *et al.*, 2005).

Otras bacterias identificadas: *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*, muestran la capacidad de remover los colorantes textiles: Rojo congo, naranja viscosa, verde directo PLS, violeta BL, azul cielo FF y negro directo E, en agua residual sintética (Saranraj *et al.*, 2010).

También están: *Shewanella putrefaciens* en el tratamiento de agua residual con colorante remazol negro B (Kamilaki, 2000); *Pseudomonas luteola* en la decoloración de rojo 22 (Chang, Chou & Chen, 2001) y *Desulfovibrio desulfuricans* en el descenso del colorante reactivo naranja 96 en aguas residuales textiles (Yoo, Libra & Wiesmann, 2000). Además, levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* en la degradación del colorante azo rojo metilo (Jadhav *et al.*, 2007) y *Candida tropicalis* en la decolorización completa del reactivo azo negro 5 (Jafari *et al.*, 2012).

1.4.4. Caracterización de un consorcio microbiano

1.4.4.1. Inóculo microbiano

Los microorganismos en el ambiente se encuentran formando asociaciones complejas (hongos, bacterias, protozoarios, cianobacterias,

entre otros). Sin embargo, pueden trabajarse a nivel de laboratorio como inóculos, es decir, como suspensiones seleccionadas para una función específica. Los inóculos pueden ser cultivos puros o mixtos, siendo estos últimos aquellos que presentan dos o más tipos de microorganismos (UGR, 2012). Un ejemplo de inóculo microbiano, es el encontrado en los lodos aerobios o anaerobios de plantas de tratamiento de aguas residuales (Mora *et al.*, 2005).

El empleo de inóculos ha sido relevante en estudios de Microbiología Aplicada y con el pasar de los tiempos, han llegado a comercializarse. Un ejemplo de ello es que en Japón y Norteamérica se tiene más de 90 tipos de aditivos microbiológicos comerciales, empleados para el tratamiento de desechos orgánicos; su aceptación en los consumidores incrementa debido a la estabilidad de resultados que estos productos ofrecen (Pacheco, 2009).

1.4.4.2. Métodos de identificación

Los microorganismos, al igual que otros entes, presentan particularidades en su crecimiento, nutrición, enzimas, material genético, reacciones químicas y condiciones físicas-químicas que toleran; siendo estas las características que ayudan a su clasificación. La sistemática oficial internacional de las bacterias se encuentra detallada en el Manual de Bacteriología Determinativa de Bergey (García *et al.*, 1997; Montoya, 2008).

La caracterización de microorganismos corresponde su identificación en una categoría taxonómica establecida: Reino – Filum – Clase – Orden – Familia - Género y Especie. Para identificar los microorganismos que conforman un inóculo, existen diversos métodos como: criterios morfológicos, tinciones diferenciales, pruebas bioquímicas, interacciones con virus bacterianos, pruebas serológicas y biología molecular (Gutiérrez, 2008).

García *et al.* (1997) y Montoya (2008) informan sobre los distintos métodos para identificar a los microorganismos, como se puntualiza a continuación.

- **Criterios morfológicos.**- actualmente, estos aspectos son solo una forma primaria para identificarlos y se basan en la distinción celular y colonial de los microorganismos.
- **Tinciones diferenciales.**- son técnicas de rigor en la identificación de microorganismos, ya que las diferentes coloraciones que toman las bacterias u hongos, permiten definirlos en grupos. Ayudan a detectar con mayor facilidad la morfología celular bajo el microscopio.
- **Tipificación de fagos.**- se basan en la interacción de un fago con una bacteria, apreciando la lisis que el fago ocasiona sobre la célula bacteriana a través de receptores específicos.

- **Ensayos serológicos.**- se basan en la reacción del anticuerpo presente en una preparación, con el antígeno que posee la célula microbiana. El ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), ha sido empleado para la detección del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli*, entre otros.
- **Pruebas bioquímicas.**- se basan en la detección de un microorganismo a través de las reacciones químicas específicas que realiza. Es un método ampliamente utilizado en el laboratorio y los patrones de identificación para cada microorganismo se han refinado con el pasar de los tiempos.
- **Biología molecular.**- corresponde a la identificación de microorganismos basándose en la detección de su material genético. Para ello, es necesario el aislamiento del microorganismo, la extracción de sus ácidos nucleicos, la amplificación del material genético por métodos como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la secuenciación de las bases de nucleótidos.

1.5. Hipótesis de investigación

Existe diferencia significativa entre los microorganismos presentes en el inóculo I5-ESPE antes y después del tratamiento de aguas residuales textiles en condiciones aerobias.

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Participantes

El trabajo de tesis fue ejecutado por Abigail Montero, con la dirección de Alma Koch Kaiser, MC. y codirección del Ing. Mat. Pedro Romero Sáker.

2.2. Zona de estudio

El proyecto se desarrolló en el laboratorio de Microbiología Ambiental del Centro de Investigaciones Científicas (CEINCI) de la ESPE - Campus Sangolquí, mismo que se ubica en: Ecuador, Provincia de Pichincha, Cantón Rumiñahui, Av. General Rumiñahui S/N.

2.3. Período de tiempo de investigación

El proyecto de tesis se desarrolló entre los meses de febrero y agosto del 2013.

2.4. Procedimiento

2.4.1. Activación del inóculo

Los inóculos microbianos que se utilizaron en este trabajo fueron proporcionados por el cepario del laboratorio de Microbiología Ambiental

del CEINCI-ESPE. El inóculo I5 original fue obtenido por Moncayo (2010) y el inóculo I5 luego del tratamiento de aguas residuales textiles en condiciones aerobias, se recolectó de la investigación de Rivadeneyra (2013).

Los inóculos fueron activados en el caldo de enriquecimiento aplicado por Jiang, Tay & Tay (2004), mismo que fue modificado en las investigaciones de Moncayo y Ayala (2010) y consta de nueve soluciones madre, detalladas en la tabla 2.1. Las soluciones se almacenaron en frascos con tapa rosca azul Boeco®, excepto por la solución de EDTA-FeSO₄ que se preservó en un frasco ámbar.

Tabla 2.1: Soluciones madre del medio de cultivo mineral empleado para la activación del inóculo I5. FUENTE: Moncayo y Ayala (2010).

Solución madre	Cantidad del compuesto químico (g)	Volumen de aforo (mL)
EDTA-FeSO ₄	0.0174 EDTA y 0.0130 FeSO ₄	500
CaSO ₄ .2H ₂ O	0.53	500
NaCl	0.7	500
K ₂ HPO ₄	7	500
MgSO ₄ .7H ₂ O	9.8	500
KH ₂ PO ₄	14	500
(NH ₄) ₂ SO ₄	28	500
Buffer	28.42 Na ₂ HPO ₄ 26.5916 NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	500
Glucosa	35	500

Se preparó 980 mL de medio mineral conformado por 350 mL de agua estéril y 70 mL de cada una de las soluciones madre previamente autoclavadas y enfriadas. En condiciones asépticas, se le añadió 20 mL del inóculo madre para conseguir 1 L de inóculo activado, luego de la

incubación a 30°C durante 48 h.

2.4.2. Aislamiento de colonias

Las cepas puras se aislaron del inóculo mixto, a través de diluciones seriadas desde 10^{-1} hasta 10^{-6} (Rodríguez *et al.*, 2006). Las diluciones se realizaron en una solución salina con 45 g de NaCl en 500 mL de agua destilada; donde 0.1 mL de cada dilución se sembró por extensión, en cajas petri con agar (Khadijah, Lee & Mohd, 2009; Rodríguez *et al.*, 2006).

Se realizó un primer aislamiento en Agar Nutriente - AN (Acumedia, Estados Unidos) para el crecimiento de microorganismos no fastidiosos y también en Agar Dextrosa y Papa - PDA (Difco Laboratorios, Estados Unidos) para potenciar el aislamiento de hongos y levaduras (Neogen Corporation, 2013).

En el segundo aislamiento se emplearon medios de cultivo selectivos como el Agar Man, Rogosa y Sharpe - MRS (Difco Laboratorios, Estados Unidos) para favorecer el crecimiento de bacilos grampositivos (Becton, Dickinson & Compañía, 2012) y el Agar Manitol Salado - MSA (BBL™, Estados Unidos) para la distinción de estafilococos (Neogen Corporation, 2013).

Las cajas petri con agar se incubaron a 30°C por 48 h para la

visualización de colonias bacterianas y hongos levaduriformes. Para hongos filamentosos, se esperó un periodo de siete a 21 días a la misma temperatura.

Los microorganismos se aislaron tomando como criterio de selección el crecimiento en las mayores diluciones donde se presentaron colonias aisladas y la apreciación de características distintivas como color, forma y tamaño entre colonias (Khadijah, Lee & Mohd, 2009; Pérez, Ruiz & Yeomans, 2004; Rodríguez *et al.*, 2006).

Para su purificación, las colonias bacterianas seleccionadas fueron repicadas dos veces por estrías en Agar Tripticosa de Soya - TSA (Difco Laboratorios, Estados Unidos) como lo sugieren Rodríguez *et al.* (2006) y Khadijah, Lee & Mohd (2009); de igual manera los hongos levaduriformes se purificaron en medio PDA como lo recomienda Martínez *et al.* (1997). Finalmente, cada colonia purificada se conservó en tubos de agar inclinado para su análisis morfológico y bioquímico.

2.4.3. Evaluación macroscópica

La descripción macroscópica de las colonias bacterianas aisladas incluyó aspectos como el tamaño, pigmentación, configuración, elevación y borde (Brown, 2001).

2.4.4. Descripción morfológica celular

La morfología de los microorganismos aislados se distinguió a través de Tinción Gram, ya que además de diferenciar entre organismos grampositivos y gramnegativos, se identificó si estos eran levaduras o formas bacterianas: coco, bacilo, cocobacilo, vibrio, espirilo o espiroquetas (Murray, Rosenthal & Pfaller, 2009).

Tоторa, Funke & Case (2007) resaltan que la tinción desarrollada por Christian Gram en 1884, se desarrolla con los siguientes pasos:

- ✓ Al frotis de la muestra, fijado con calor, se lo recubre con colorante primario (violeta de genciana) y se lo deja actuar durante un minuto.
- ✓ La placa se lava con agua y se le agrega lugol, durante un minuto, para retener el colorante primario.
- ✓ Después, se lava el preparado y se añaden 10 gotas del agente decolorante alcohol-acetona.
- ✓ Finalmente, se tiñe la muestra con el colorante de contraste (safranina) y luego de un minuto, el portaobjetos se lava con agua y se seca en papel absorbente.

2.4.5. Análisis bioquímico

La identificación bioquímica de bacterias se realizó siguiendo las claves bibliográficas que se indican en los anexos A a F.

Los hongos levaduriformes también se identificaron mediante claves bibliográficas, considerando la asimilación de fuentes de carbono en un auxonograma y su fermentación anaerobia en un zimograma, detallados en los anexos G a I (Pemán, Mazuelos & Rubio, 2007).

2.4.6. Análisis confirmatorio

Los resultados obtenidos de las pruebas morfológicas y bioquímicas se confirmaron con el Índice Analítico del Perfil API® (BioMérieux, Francia). Para *Enterobacteriaceae*, API 20E; *Bacillus*, API 50CHB; *Staphylococci*, API Staph y levaduras, API 20C AUX.

Cada sistema minaturizado API® se llenó conforme lo indica el manual del usuario y su resultado se reveló con la plataforma virtual APIweb (BioMérieux, 2009).

2.5. Análisis estadístico

Las gráficas descriptivas de los datos se efectuaron en el programa Microsoft Office Excel 2007 y el análisis comparativo se realizó con el software estadístico InfoStat, considerando elementos como las tablas de contingencia de Boesch, prueba chi-cuadrada de independencia, prueba exacta de Fisher, coeficiente ϕ , razón de probabilidades (OR), índice estadístico de Jaccard e índice estadístico de Dice-Sorensen.

CAPÍTULO 3: RESULTADOS

3.1. Activación del inóculo

El medio mineral de Jiang *et al.* (2004) modificado por Ayala y Moncayo (2010) permitió la activación de los inóculos I5 original e I5 luego del tratamiento de aguas residuales textiles en condiciones aerobias, como se aprecia en la figura 3.1.

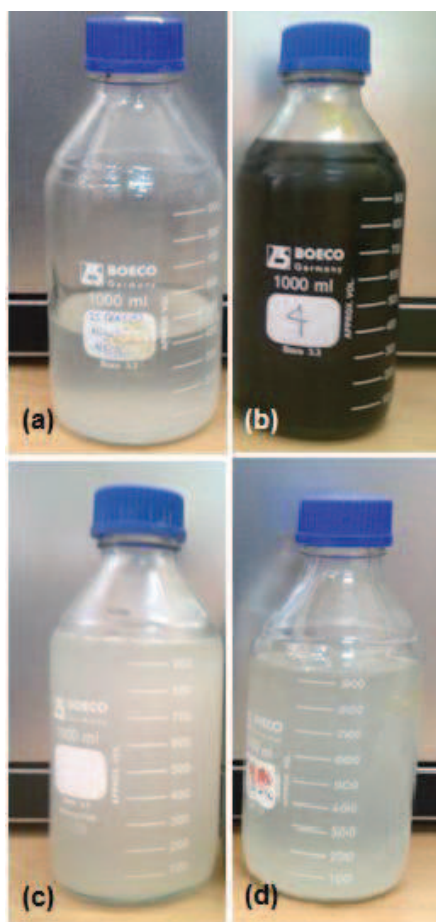


Figura 3.1: Inóculo I5-ESPE proporcionado por el cepario de Microbiología Ambiental – CEINCI (a) original, (b) luego del tratamiento; e inóculo activado (c) original, (d) luego del tratamiento. FUENTE: Montero (2013).

3.2. Aislamiento de colonias

El primer aislamiento realizado en Agar Nutriente y PDA permitió la selección de 13 colonias microbianas: cinco en el inóculo antes del tratamiento (A-TART) y ocho en el inóculo después del tratamiento de aguas residuales textiles en condiciones aerobias (D-TART). El segundo aislamiento, efectuado en Agar MRS y Agar Manitol Salado, permitió la recopilación de seis colonias A-TART y tres D-TART. Finalmente, luego de 21 días de incubación en medio PDA, no se apreció el crecimiento de hongos filamentosos en los inóculos (figuras 3.2 y 3.3).

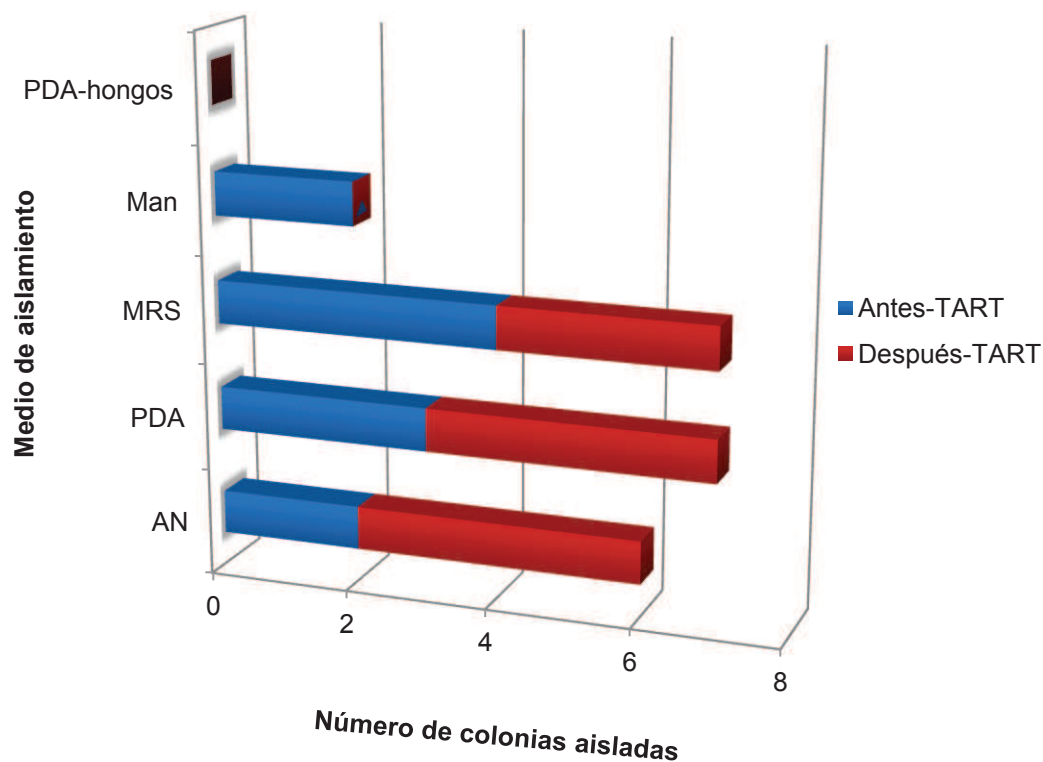


Figura 3.2: Número de colonias aisladas en el inóculo I5-ESPE antes y después del tratamiento de aguas residuales textiles (TART). FUENTE: Montero (2013).

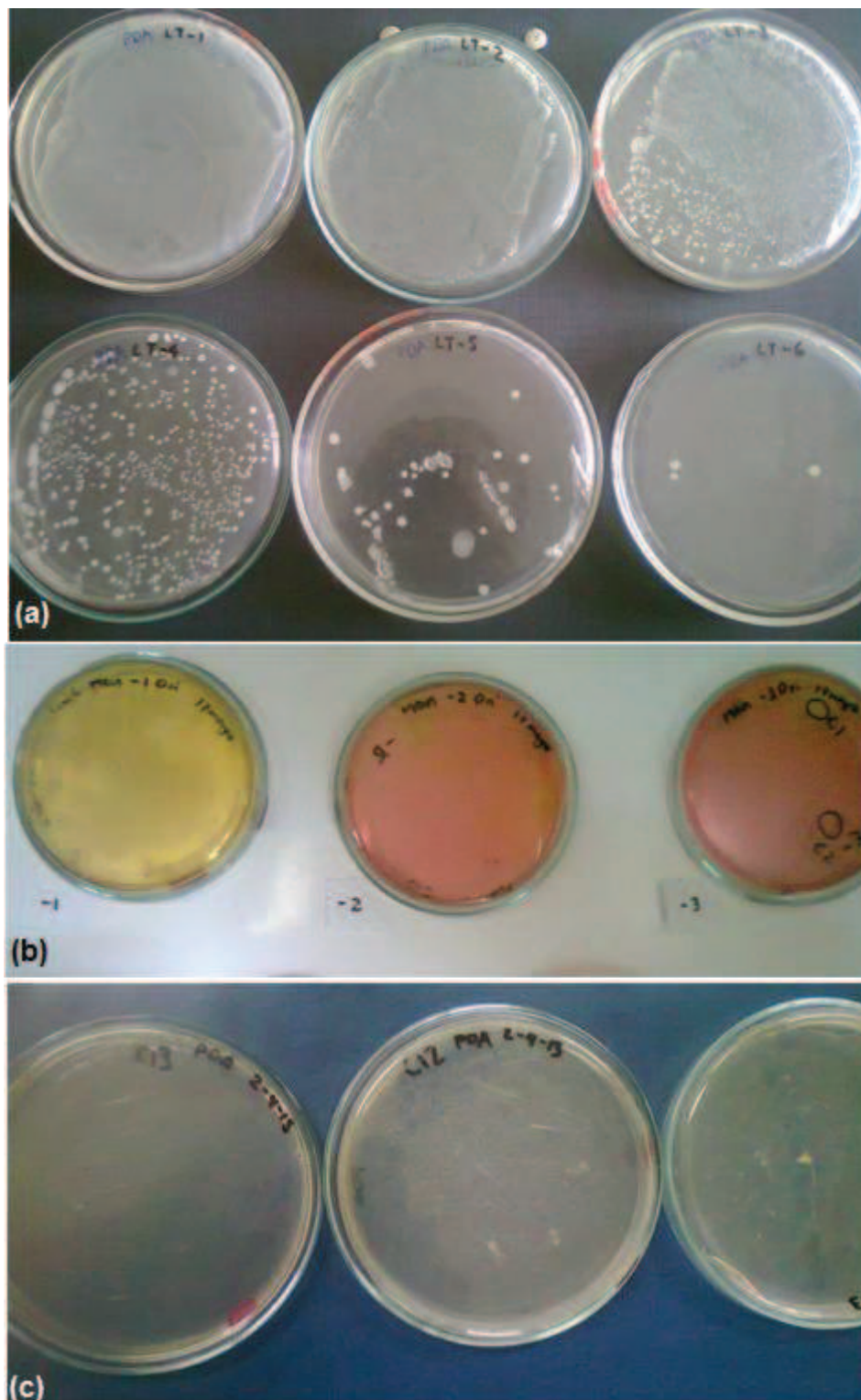


Figura 3.3: Aislamiento de colonias microbianas del inóculo I5 luego de 48 h en (a) medio PDA, (b) Agar Manitol Salado; y (c) PDA luego de 21 días para hongos filamentosos. FUENTE: Montero (2013).

3.3. Evaluación macroscópica

Las 22 colonias aisladas se distinguieron según su tamaño, pigmentación, configuración, elevación y borde, tal como se muestra en la figura 3.4.

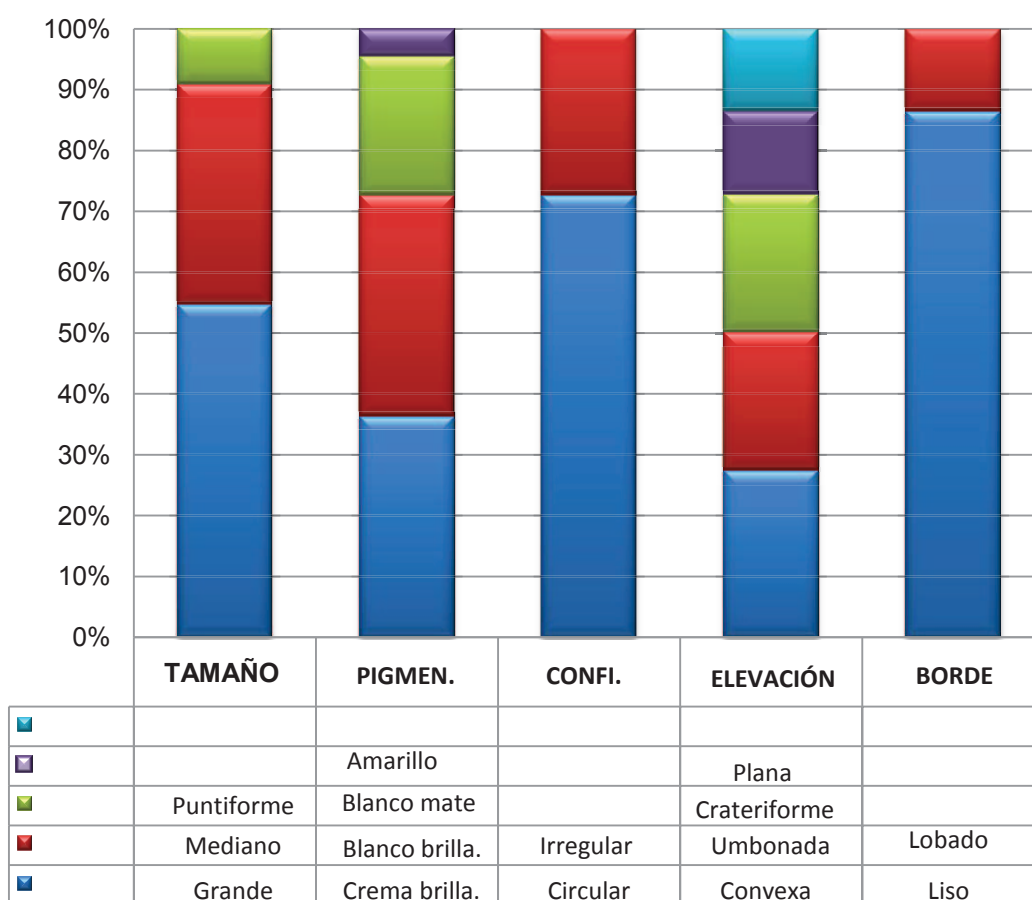


Figura 3.4: Porcentaje de las colonias aisladas del inóculo I5 considerando diversos criterios de evaluación macroscópica. FUENTE: Montero (2013).

3.4. Descripción morfológica celular

La tinción Gram permitió la diferenciación de los microorganismos en levaduras, bacilos grampositivos, bacilos gramnegativos y cocos grampositivos, según porcentajes mostrados en la figura 3.5 y como se ilustran en la figura 3.6.

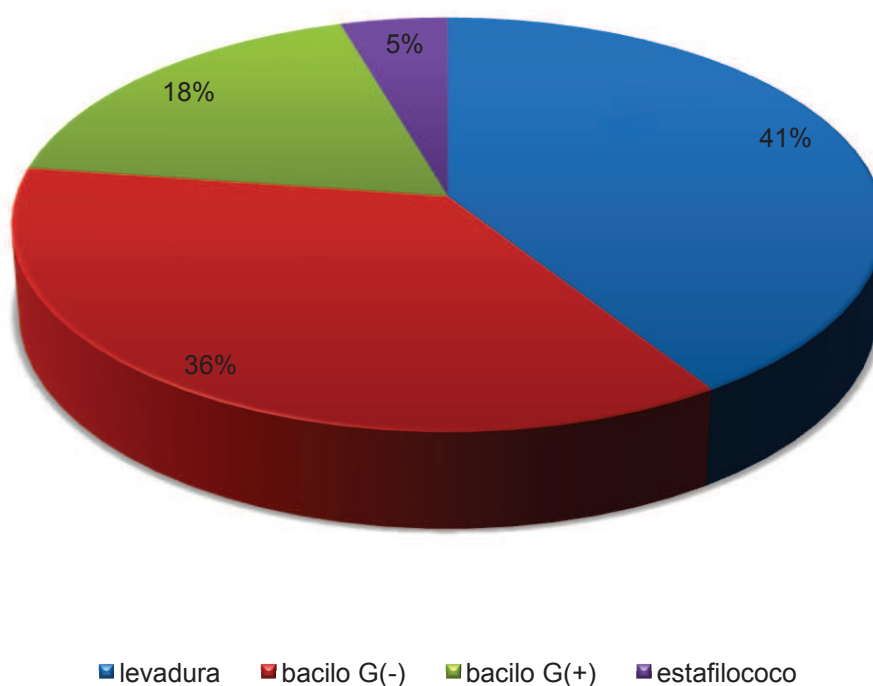


Figura 3.5: Morfología celular de las colonias aisladas del inóculo I5, luego de la tinción Gram. FUENTE: Montero (2013).

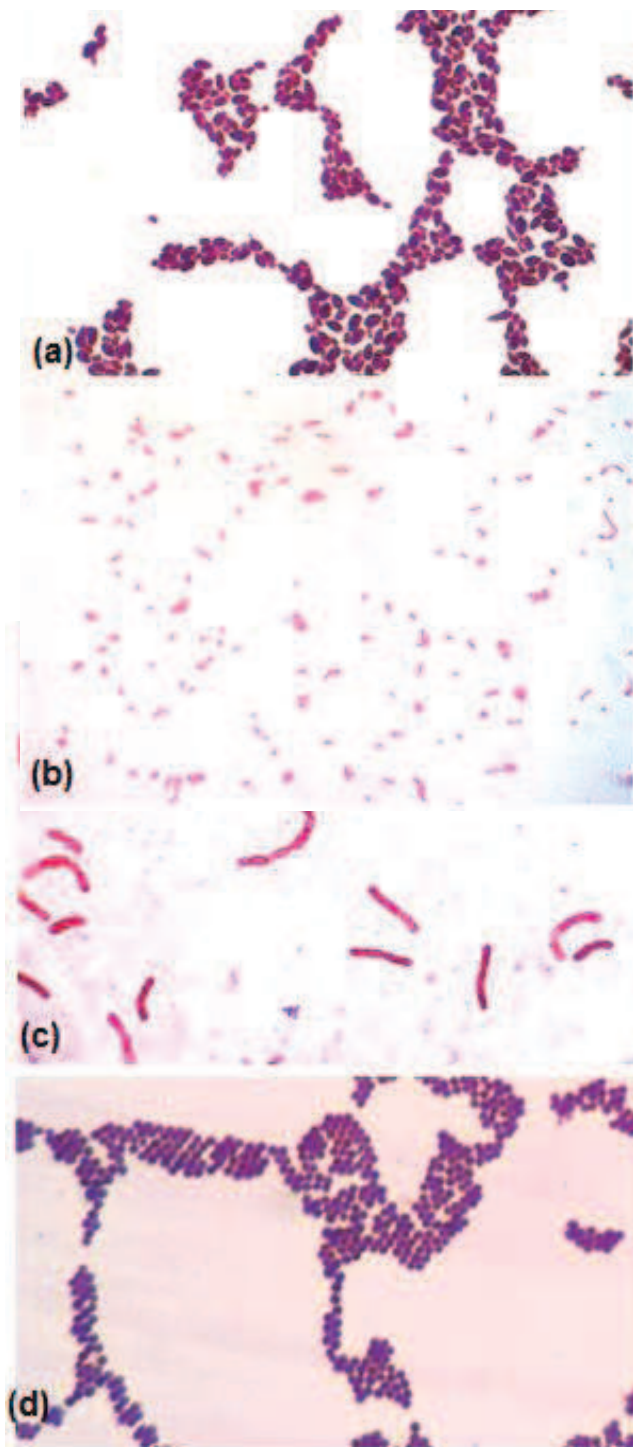


Figura 3.6: Descripción morfológica celular de colonias aisladas del inóculo: (a) levaduras, (b) bacilos gramnegativos, (c) bacilos grampositivos esporulados y (d) estafilococos. FUENTE: Montero (2013).

3.5. Análisis bioquímico

Las claves bibliográficas de identificación microbiana permitieron la caracterización de las colonias aisladas, en las especies: *Enterobacter cloacae* (colonias C6AN, C7AN, C8AN, C9AN, C10PDA, C11PDA, C12PDA, C13PDA); *Bacillus subtilis* (colonias C3MRS, C6MRS, C7MRS); *Bacillus megaterium* (colonia C5MRS); *Staphylococcus xylosus* (colonia C1MSA); *Saccharomyces cerevisiae* (colonias C1AN y C4MRS); y *Candida tropicalis* (C2AN, C3PDA, C4PDA, C5PDA, C1MRS, C2MRS, C2MSA). Su presencia en el inóculo I5-ESPE antes o después del tratamiento de aguas residuales textiles, se muestra en la figura 3.7.

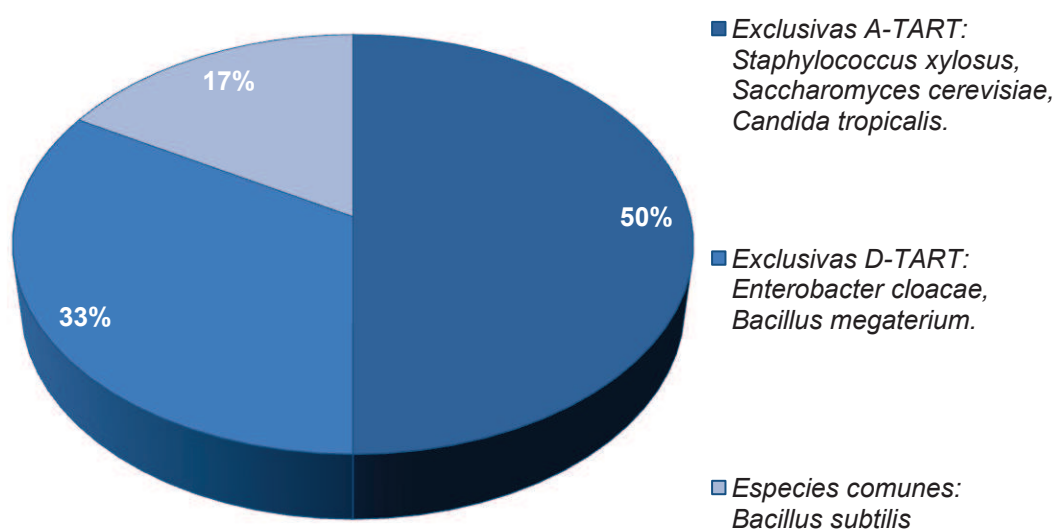


Figura 3.7: Especies microbianas presentes en el inóculo I5-ESPE antes (A-TART) y después (D-TART) del tratamiento de aguas residuales textiles. FUENTE: Montero (2013).

Los resultados de las pruebas bioquímicas efectuadas a cada colonia se detallan en los anexos J – M; varias se exponen en la figura 3.8.

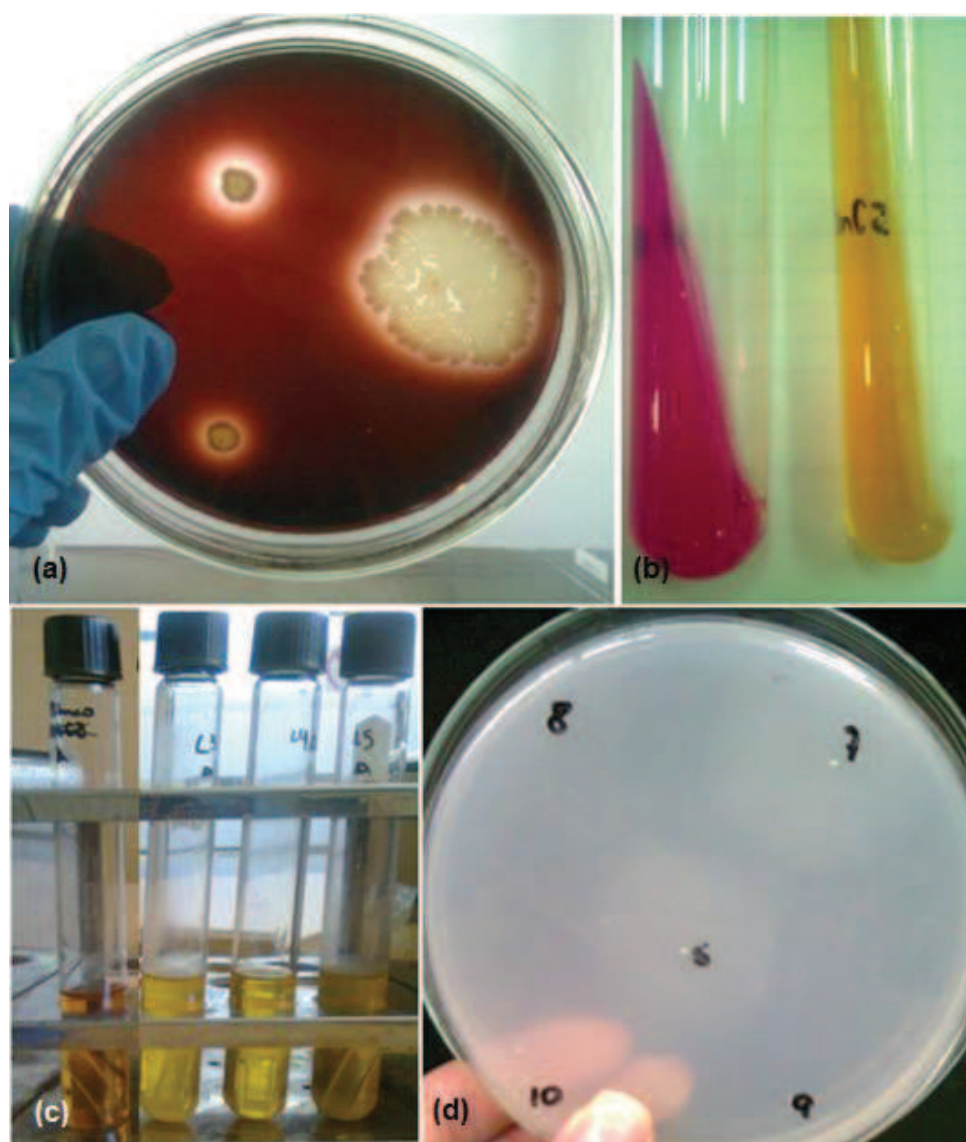


Figura 3.8: Pruebas bioquímicas efectuadas a las colonias aisladas del inóculo I5 (a) hidrólisis del almidón, (b) hidrólisis de la urea, (c) fermentación de azúcares, con formación de ácido y (d) auxonograma. FUENTE: Montero (2013).

3.6. Análisis confirmatorio

El sistema miniaturizado API® confirmó las especies encontradas en el análisis bioquímico del inóculo I5; específicamente, API 20E validó la presencia de *Enterobacter cloacae*, API 50CHB confirmó *Bacillus subtilis* y *Bacillus megaterium*, API Staph corroboró con *Staphylococcus xylosus*; y API 20C AUX validó *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida tropicalis* (anexo N).

3.7. Análisis estadístico

La tabla de contingencia para el análisis comparativo de los inóculos evidenció que existe diferencia entre ellos; así, en los elementos de la tabla se distinguió que los inóculos poseen un atributo común, que el inóculo antes del tratamiento tiene tres atributos exclusivos y el inóculo después del tratamiento posee dos atributos exclusivos (figura 3.9).

La tabla de contingencia expuso valores menores a cinco, por ello se deduce que la prueba chi-cuadrada de independencia no es aplicable y en su lugar se consideró la prueba de Irwin-Fisher para conseguir valores exactos de significancia. Así, el valor Fisher bilateral = -0.75, $p > 0.05$ señala que la diferencia observada entre los inóculos I5 A-TART y D-TART es estadísticamente significativa.

De la tabla 2×2 también se deducen los coeficientes de contingencia V Crámer = 0.5; $K = 0.58$; $\phi = -0.71$ que expresan la intensidad de la relación entre el inóculo I5 A-TART e I5 D-TART. Asimismo, se constató una relación nula ($OR_{1/2} = 0.00$) entre la diferencia de los inóculos y el cambio en una unidad de las variables.

Tablas de contingencia

Frecuencias: FRECUENCIA

Frecuencias absolutas

En columnas: D-TART

A-TART	0	1	Total
0	0	2	2
1	3	1	4
Total	3	3	6

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	3.00	1	0.0833
Chi Cuadrado MV-G2	3.82	1	0.0507
Irwin-Fisher bilateral	-0.75		0.2000
Coef. Conting. Cramer	0.50		
Coef. Conting. Pearson	0.58		
Coeficiente Phi	-0.71		

Cocientes de chance (odds ratio)

Estadístico	Estim	LI 95%	LS 95%
Odds Ratio 1/2	0.00	sd	sd

Figura 3.9: Tabla de contingencia y comparación estadística de los inóculos I5 antes (A-TART) y después (D-TART) del tratamiento de aguas residuales, mediante la asistencia del programa InfoStat. FUENTE: Montero (2013).

Los índices estadísticos de Jaccard y Dice-Sorensen (figura 3.10) se obtuvieron mediante un análisis multivarianza hasta conseguir matrices de distancia y similarides en el software Infostat.

El índice de Jaccard expresó la baja proporción de especies comunes en los inóculos ($1 - I_J = 0.86$) y el índice de Dice-Sorensen manifestó la disimilitud entre las entidades de estudio ($1 - S = 0.75$).

Matrices de distancias y similaridades

Jaccard (1-S)

	A-TART	D-TART
A-TART	0.00	
D-TART	0.86	0.00

Dice (1-S)

	A-TART	D-TART
A-TART	0.00	
D-TART	0.75	0.00

Figura 3.10: Índice de Jaccard e índice de Dice-Sorensen para la comparación del inóculo I5 antes y después del tratamiento de aguas, mediante la asistencia del programa InfoStat. FUENTE: Montero (2013).

CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN

4.1. Activación del inóculo

Forbes, Sahm & Weissfeld (2009) señalan que el crecimiento microbiano en un medio de cultivo líquido se revela con el cambio de su apariencia translúcida a turbia; aspecto ocasionado por la deflexión de la luz debida a la abundancia de células en el caldo de cultivo.

Como se ilustra en la figura 3.1 de resultados, los inóculos I5 antes (A-TART) y después (D-TART) del tratamiento de aguas residuales textiles, se tornaron turbios luego de 48 h de incubación a 30 °C en medio mineral Jiang modificado (2010); sugiriendo que el medio de cultivo utilizado cumple con los requerimientos nutricionales para la multiplicación de los dos inóculos microbianos.

También, para apreciar la turbidez a simple vista, es necesario conseguir una concentración de 10^6 microorganismos.mL⁻¹ de medio líquido (Forbes, Sahm & Weissfeld, 2009). Por ello, ya que la turbidez fue apreciable en los inóculos I5 A-TART y D-TART activados, se estima que la concentración microbiana alcanzó el orden 10^6 y de igual manera, Montenegro (2010) recalca una concentración de 10^8 células.mL⁻¹ de medio mineral en el inóculo I5 activado a las mismas condiciones de tiempo y temperatura.

4.2. Aislamiento de colonias

El aislamiento de las colonias dio un indicio de la diferencia en la conformación de los inóculos I5 antes y después del tratamiento de aguas residuales textiles. Un ejemplo de ello fue el aislamiento en medio selectivo MSA, donde se obtuvieron colonias del inóculo A-TART pero no del inóculo D-TART.

Dentro del aislamiento, el aspecto en el cual los dos inóculos presentaron semejanza, es en la ausencia de hongos filamentosos. En la biorremoción de aguas residuales, Rodríguez (2011) señala que la presencia de hongos filamentosos no es habitual pues requieren condiciones ambientales especiales de pH y nitrógeno. También, Dan *et al.* (2002) señalan que durante el tratamiento biológico de agua residual, existe un incremento de la concentración salina debido a la reducción de elementos biodegradables. Este aumento en la salinidad afecta únicamente a poblaciones sensibles como las de protozoarios y hongos filamentosos, al contrario de bacterias y levaduras que se adaptan al medio.

Looi (2009) incluso aisló un consorcio mixto formado únicamente por bacterias (*Bacillus* sp., *Paenibacillus* sp., *Achromobacter* sp.); en otras palabras, sin el requerimiento de hongos u otros microorganismos, logró la remoción de colorantes de agua residual textil en un 51.40%.

4.3. Evaluación macroscópica y morfológica celular

Para el tratamiento de aguas residuales de una tintorería, Galeano & Osorio (2009) aislaron colonias con diferentes tamaños, color, forma y aspecto; de sus 20 colonias aisladas, predominaron las colonias categorizadas como grandes, redondas y lisas. Con respecto a su morfología celular, se encontraron levaduras, un cocobacilo, bacilos gramnegativos y grampositivos. Con ello se demuestra la diversidad encontrada en estudios relacionados.

Con respecto a las 22 colonias aisladas del inóculo I5 A-TART y D-TART, se constató predominancia dentro de los criterios de evaluación, como lo fueron: tamaño (colonias grandes en un 55%), pigmentación (colonias blanca y crema brillantes en un 72%), configuración circular 73%, elevadas 27% y con borde liso 86%.

En el estudio realizado por García (2011) se reveló por micrografía, la existencia de levaduras y bacilos gramnegativos en la conformación del inóculo I5-ESPE. En la presente investigación, se realizó un aporte al análisis morfológico celular del inóculo I5, pues además de levaduras (en un 41%) y bacilos gramnegativos (36%), se obtuvieron colonias de bacilos grampositivos (18%) y cocos grampositivos (5%).

4.4. Análisis bioquímico y confirmatorio

Las especies pertenecientes al inóculo I5 antes del tratamiento de aguas residuales son *Staphylococcus xylosus*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida tropicalis*; las especies exclusivas del inóculo I5 después del tratamiento de aguas residuales textiles en condiciones aerobias son *Enterobacter cloacae* y *Bacillus megaterium*. Finalmente, la especie común encontrada antes y después del tratamiento es *Bacillus subtilis*.

Las especies caracterizadas con el análisis bioquímico y confirmadas con pruebas API® corresponden a microorganismos reconocidos dentro del tratamiento de aguas residuales. Así, *Bacillus subtilis* figura en reportes de los años 70, como una de las primeras especies aisladas capaces de degradar colorantes en aguas residuales textiles (Butani *et al.*, 2013). Se reconoce que *B. subtilis* transforma nitritos, asimila amonio y degrada la pectina de ciertas aguas residuales (Li, 2010). También, aunque las lacasas son enzimas generalmente encontradas en hongos, *B. subtilis* figura entre las bacterias que poseen CotA-lacasa, permitiendo la reducción del colorante azo naranja sudan G en un 50% (Pereira *et al.*, 2009).

Bacillus megaterium a pH 6, 37°C y bajo condiciones aerobias, removió el colorante azo rojo 3BN en un 96.88% (Praveen & Bhat, 2012). También, a pH 7 y 37°C, *B. megaterium* redujo el colorante azul BB de un efluente industrial, hasta un 84%. El inóculo I5 D-TART se mantuvo a un

pH entre 6.5 y 8, con niveles de oxígeno disuelto de 6 a 8 mg.L⁻¹ (Rivadeneira, 2013); considerándolos como condiciones aceptables para la subsistencia de *Bacillus megaterium* en el inóculo luego del tratamiento de aguas residuales textiles.

En el estudio de Wang *et al.* (2009) la acción de *Enterobacter cloacae* permitió la remoción del colorante reactivo negro 5 en un 92.6%. Igualmente, en el estudio de Barakat *et al.* (2009) un consorcio conformado por *Enterobacter cloacae* y *Bacillus* spp logró la disminución del 75% de la DQO en aguas con colorante reactivo rojo RR, bajo condiciones aerobias.

Staphylococcus xylosus es usado en el tratamiento de efluentes salinos debido a su tolerancia a la sal. Las procesadoras de productos del mar, curtido e industrias químicas, se caracterizan por emitir aguas residuales altamente salinas (Hari & Lea, 2010). Por otro lado, en el estudio de Ziagova & Liakopoulou (2010), *S. xylosus* consiguió la remoción de compuestos aromáticos (1,2-diclorobenceno, 2,4-diclorofenol y 4-Cl-m-cresol) en el tratamiento biológico de aguas residuales.

Saccharomyces cerevisiae permite la biorremoción de colorantes reactivos debido a la presencia de lacasas, como lo señalan Forgacs, Cserhádi & Orosb (2004) con respecto a la reducción del colorante azul 19 en aguas residuales. También Saratale *et al.* (2009) resaltan la

participación de *S. cerevisiae* en la decoloración de verde malaquita y rojo metilo.

Candida tropicalis logró remociones de 30 hasta 97% del colorante sintético RB 5, además de la reducción de otros colorantes reactivos azo y colorantes de antraquinona; esto debido a que posee la enzima Manganese Peroxidasa (MnP) (Yang *et al.*, 2003). También, en el estudio de Saravanan, Pakshirajan & Saha (2008) se resalta a *Candida tropicalis* como una especie degradadora de fenol.

Butani *et al.*, (2013) señala que los microorganismos que remedian agua residual en condiciones aerobias, utilizan el oxígeno disuelto en el agua para transformar los contaminantes en dióxido de carbono y también para oxidar la materia orgánica del efluente; considerándose el último aspecto como necesario para la generación de nuevas células microbianas.

De igual manera, estudios recientes recalcan que las bacterias pueden mineralizar los colorantes reactivos en condiciones aerobias, por la sulfato reducción de tales contaminantes (Butani *et al.*, 2013) por la secreción de azoreductasas aerobias (Russ, Rau & Stolz, 2000) que catalizan la reducción de NADPH de los los compuestos azo en los anillos aromáticos, fragmentando la molécula y por lo tanto, favoreciendo la remoción de los colorantes en el tratamiento de aguas residuales (Knackmuss & Stolz, 2002).

Las azoreductasas, enzimas que se desenvuelven a temperaturas entre 30 y 40°C, permiten la ruptura de los enlaces azo de los colorantes reactivos (Ramya, Anusha & Kalavanthy, 2008). Debido a que los microorganismos aislados del inóculo I5 son mesófilos, es decir, crecen entre los 8 y 40°C, es probable que la acción de las enzimas que permiten la remoción de colorantes se favorezca por tal rango de temperatura.

4.5. Comparación del inóculo I5 antes y después del tratamiento de aguas residuales textiles en condiciones aerobias

La diferencia observada entre los inóculos I5 A-TART y D-TART es estadísticamente significativa (Fisher bilateral = -0.75, $p > 0.05$). Se determinó el test exacto de Fisher como estadístico de prueba debido a que en la tabla de contingencia 2×2 se obtuvieron valores menores a cinco en más de un 20%, razón por la cual, el estadístico χ^2 Pearson y el cociente de máxima verosimilitud (χ^2 MV-G2) no fueron aplicables (Rosner, 2010).

Con respecto a la intensidad de la relación entre las variables, se encontró una relación moderada entre el inóculo I5 A-TART e I5 D-TART (V Crámer = 0.5; Coeficiente K= 0.58; $\phi = -0.71$). Con ello, en la tabla de contingencia, los atributos positivos en el inóculo I5 antes del tratamiento no necesariamente son positivos después del tratamiento de aguas residuales textiles.

La diferencia observada entre los inóculos y el cambio en una unidad de las variables, tampoco mantienen una relación ($OR^{1/2} = 0.00$).

Los inóculos I5 A-TART e I5 D-TART presentan un bajo índice de especies comunes ($I_J = 0.14$) y además, manifiestan disimilitud entre las entidades de estudio ($S = 0.25$).

La diferencia entre el inóculo I5 antes y después del tratamiento de aguas residuales textiles en condiciones aerobias, se debe al cambio al que fue sometido el inóculo, pues el proceso de tratamiento del aguas conllevó diferentes valores de pH, temperatura, oxígeno, nutrientes, además del número de microorganismos y su diversidad. Snellinx *et al.* (2003) señalan que solo algunas especies microbianas son capaces de resistir un cambio prolongado, específicamente solo las especies capaces de tolerar altas concentraciones de agentes químicos y de asimilar los subproductos creados por los microorganismos degradadores iniciales.

Looi (2009) señala que para la remoción de colorantes en aguas residuales, se emplean consorcios de diferentes especies microbianas, en los cuales, un microorganismo puede empezar la transformación del colorante haciéndolo más accesible a la biotransformación por parte de otro organismo.

Por ello, los microorganismos del inóculo I5 A-TART son viables para el inicio del tratamiento, pero en el proceso, las nuevas condiciones

resultan adversas para su crecimiento. Por el contrario, el surgimiento de nuevos microorganismos en el inóculo I5 D-TART se debe a que las condiciones iniciales no eran las ideales para su crecimiento, pero se potenciaron con las nuevas condiciones del proceso. La especie común, *B. subtilis*, fue aquella que se adaptó al cambio.

En el análisis micromorfológico de Vargas *et al.* (1992) se señala que las poblaciones de bacilos grampositivos tienden a aumentar luego del tratamiento de aguas por su adaptación a nuevas condiciones ambientales, al tiempo de residencia celular y a la variabilidad del agua; misma que en un principio tuvo más fuentes de carbono (a manera de polisacáridos) para ser consumidas por los microorganismos.

Knackmuss & Stolz (2002) lograron la remoción del compuesto 4,4-dicarboxi-azobenceno mediante la adaptación aerobia de un cultivo mixto de bacterias. Para ello, cientos de generaciones provenientes de un inóculo primario, se cultivaron en efluentes con compuestos azo, hasta obtener un inóculo estable y con alta remoción. Por ello, encontrar otras especies luego de un tratamiento, no significa la pérdida de su funcionalidad, sino la adaptación del mismo, tal como ocurrió con el inóculo I5.

Los mecanismos de adaptación del inóculo I5 fueron el enriquecimiento selectivo y la alteración del entorno, pues en ellos, los microorganismos de un consorcio sufren un cambio considerable al

someterse a nuevas condiciones. Otros mecanismos como el intercambio de información genética, cambio de herencia genética y la regulación de enzimas, no conllevan cambio en la conformación del consorcio (Rittmann & McCarty, 2001).

En el primer mecanismo de adaptación, los microorganismos crecen selectivamente debido a dos razones: metabolizan los contaminantes nutriéndose de ellos o resisten la exposición a compuestos tóxicos. El segundo mecanismo, sugiere la alteración del entorno para que el consorcio conlleve la biodegradación (Rittmann & McCarty, 2001). De esta forma, es probable que *B. subtilis* al encontrarse en los inóculos I5 A-TART y D-TART resistió al cambio mediante el enriquecimiento selectivo; a su vez, el resto de especies encontradas, alteraron el entorno a través de la eliminación de toxicidad y la variación de pH por reacciones con productos básicos, pues el inóculo A-TART se trabajó con un pH entre 5 y 6 (Moncayo, 2010) mientras que con el inóculo D-TART, el pH se mantuvo entre 6.5 y 8 (Rivadeneira, 2013).

Aunque existe un cambio significativo antes y después del tratamiento, no se debe restar relevancia al inóculo inicial pues fue el encargado de brindar una primera respuesta a las variaciones del efluente, emprender la biorremoción y facilitar sustratos para la adaptación de otros microorganismos. Knobelsdorf (2005) indica que los microorganismos manejan el tratamiento biológico de aguas residuales en diferentes etapas; en un principio, ciertos microorganismos asimilan la

materia orgánica generando productos secundarios que favorecen el crecimiento de otros entes que continúan con la eliminación de contaminantes. En su estudio, para establecer una población bacteriana que remueva fósforo en el agua residual, fue necesario que el efluente tenga el suficiente carbono orgánico, liberado por bacterias previas a este punto del tratamiento.

Con respecto a las especies bacterianas encontradas en el inóculo I5 después del tratamiento de aguas residuales, se considera el estudio de Bahía (2009) donde se expresa que la biomasa se genera espontáneamente en la operación del reactor debido a concentraciones reducidas de microorganismos existentes en el agua residual; de igual manera, Velázquez (2005) expone que los lodos activados tienen bacterias que pueden generarse en tiempos extremadamente lentos y que aún empleando un medio no selectivo para su aislamiento, no se presentan como significantes en un consorcio hasta que se potencien las condiciones físico-químicas para su crecimiento.

Finalmente, Vargas *et al.* (1992) resaltan que la actividad metabólica total de un consorcio microbiano depende de su conformación particular, de la interacción entre sus especies y del comportamiento individual de cada microorganismo a diversos sustratos o ambientes; además Knobelsdorf (2005) destaca que no existe un único organismo que pueda metabolizar todos los compuestos presentes en las aguas residuales. De esta forma, la conformación exclusiva del inóculo I5 insinúa

que no cualquier microorganismo servirá con la misma eficacia en la remoción de contaminantes propios de aguas residuales textiles y que la sinergia entre sus individuos es necesaria para cumplir con su función.

CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES

El inóculo I5 antes del tratamiento de aguas residuales textiles es diferente al inóculo I5 después del tratamiento en condiciones aerobias, manifestándose una proporción de 14% de especies comunes y una disimilitud del 75% entre los consorcios.

Las especies pertenecientes al inóculo I5 antes del tratamiento de aguas residuales son *Staphylococcus xylosum*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida tropicalis*; las especies exclusivas del inóculo I5 después del tratamiento de aguas residuales textiles en condiciones aerobias son *Enterobacter cloacae* y *Bacillus megaterium*; la especie común encontrada antes y después del tratamiento es *Bacillus subtilis*.

El inóculo I5 original (Moncayo, 2010) y el inóculo obtenido luego del tratamiento de aguas residuales textiles en condiciones aerobias (Rivadeneira, 2013) lograron activarse en medio Jiang *et al.* (2004) modificado, a iguales condiciones de temperatura y tiempo (30°C y 48 h de incubación).

Se aislaron 22 colonias entre bacterias y hongos levaduriformes aerobios mesófilos con 48 horas de incubación y hubo ausencia de hongos filamentosos luego de 21 días de incubación, pues son especies inusuales en el tratamiento de aguas residuales (Rodríguez, 2011).

Los cultivos puros obtenidos del inóculo I5 antes y después del tratamiento de aguas residuales textiles en condiciones aerobias, constituyeron levaduras en un 41%, bacilos gramnegativos 36%, bacilos grampositivos 18% y cocos grampositivos 5%.

CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES

Con el afán de conocer las enzimas involucradas en la biorremoción de colorantes reactivos azo en la especie adaptada al tratamiento de aguas residuales textiles, se recomienda analizar por técnicas de biología molecular a la especie *Bacillus subtilis* encontrada en el inóculo I5 A-TART y D-TART.

Para alcanzar etapas finales en el proyecto “Obtención de un inóculo bacteriano nativo capaz de degradar compuestos contaminantes típicos en efluentes de industrias textiles para que sea utilizado como biomasa en plantas de tratamiento biológico de aguas residuales a escala real”, es preciso evaluar la biorremoción de demanda química de oxígeno de aguas residuales textiles por parte del inóculo I5, en un reactor aerobio y uno anaerobio consecutivos.

CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA

- AITE. (2012). *Industria Textil*. Obtenido de Asociación de Industriales Textiles del Ecuador: http://www.aite.com.ec/index.php?option=com_content&view=article&id=7&Itemid=12
- Ajibola, O., Oniye, S., Odeh, C., Olugbodi, T. & Umeh, U. (2005). Biodegradation of indigo containing textile effluent using some strains of bacteria. *Journal of Applied Sciences*, 5(5), 853 - 855.
- Al-Kdasi, A., Idris, A., Saed, K. & Teong, C. (2004). Treatment of textile wastewater by advanced oxidation processes. *Global Nest*, 6(3): 222-230.
- Allison, S. & Martiny, J. (2008). Resistance, resilience and redundancy in microbial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 11512-11519.
- ATEXGA. (2008). *Guía de prevención de riesgos laborales*. Obtenido de <http://www.atexga.com/prevencion/es/guia/el-proceso-textil.php>
- Ausín, M. (2011). *Universidad Carlos III, Madrid*. Obtenido de Técnicas de inferencia estadística: Contrastes de independencia: <http://halweb.uc3m.es/esp/Personal/personas/causin/esp/2010-2011/Inferencial/tema7.pdf>
- Ayala, D. (2010). Obtención de un inóculo bacteriano, proveniente de suelo contaminado por agua residual textil, capaz de degradar colorantes textiles reactivos en condiciones aerobias a escala de laboratorio. Tesis. Sangolquí: Escuela Politécnica Del Ejército.
- Bahía, B. (2009). *Microbiología de las aguas residuales*. Argentina: Universidad Tecnológica Nacional.
- Barakat, O., Darwesh, M., Sedik, Z., Moawad, H. & Abd, W. (2009). Evidence of biodegradation of reactive red textile azo dye in anoxic/aerobic bioremediation system. *Conference on recent technologies in agriculture*. Giza: Universidad del Cairo.
- Becton, Dickinson & Compañía. (2012). *Difco laboratorios*. Recuperado el 8 de Julio de 2013, de <http://www.bd.com/ds/>
- BioMérieux. (2009). *API*. Recuperado el 8 de Julio de 2013, de <http://www.biomerieux-usa.com/>

- Brown, A. (2001). *Benson's Microbiological Applications*. Auburn: Mc Graw Hill.
- Bur, A. (2013). Marketing sustentable. Utilización del marketing sustentable en la industria textil y de la indumentaria. En T. Domenech, & S. González, *Centro de Estudios en Diseño y Comunicación* (págs. 133-142). Buenos Aires: Universidad de Palermo.
- Butani, N., Jobanputra, J., Bhatiya, P. & Patel, R. (2013). Recent biological technologies for textile effluent treatment. *International Research Journal of Biological Sciences*, 2 (6), 77-82.
- Chang, J., Chou, C. & Chen, S. (2001). Decolorization of azo dyes with immobilized *Pseudomonas luteola*. *Process Biochemistry*, 36:757-63.
- Dan, N., Visvanathan, C., Polprasert, C. & AimDuring, B. (2002). High salinity wastewater treatment using yeast and bacterial membrane bioreactors. *Water science and technology*, 46(9):201-209.
- Forbes, B., Sahm, D. & Weissfeld, A. (2009). *Bailey & Scott: diagnóstico microbiológico*. Buenos Aires: Médica Panamericana.
- Forgacs, E., Cserhádi, T. & Orosb, G. (2004). Removal of synthetic dyes from wastewaters: a review. *Elsevier*, 953-971.
- Galeano, A. & Osorio, L. (2009). Evaluación de la biodegradación como alternativa para el tratamiento de aguas residuales de una tintorería y lavandería. En U. d. EAFIT, *Cuadernos de investigación* (págs. 96-106). Medellín: EAFIT.
- García, D. (2011). Evaluación de la capacidad de biorremoción de zinc en agua sintética de dos consorcios microbianos nativos, a escala de laboratorio. Tesis. Sangolquí: Escuela Politécnica Del Ejército.
- García, P., Fernández, M. & Paredes, F. (1997). *Microbiología clínica aplicada*. Madrid-España: Díaz de Santos.
- Guevara, D. (2010). Biorremoción de cromo (cromo total y cromo VI) en agua sintética por dos inóculos bacterianos nativos compuestos, a escala de laboratorio. Tesis. Sangolquí: Escuela Politécnica Del Ejército.
- Gutiérrez, S. (2008). *Identificación de bacterias*. Obtenido de Universidad Central de Venezuela: http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/08_Tema_12_identificaci%C3%B3n.pdf
- Hari, B. & Lea, M. (2010). *Biological treatment of saline wastewater using salt tolerant microorganisms in batch reactors*. Trivandrum: Colegio de ingenieros civiles.

- Harrigan, W. (1998). *Laboratory Methods in Food Microbiology*. San Diego: Academic Press.
- Herrera, A. (2000). *La clasificación numérica y su aplicación en la ecología*. Santo Domingo: Instituto Tecnológico de Santo Domingo.
- Jadhav, J., Parshetti, G., Kalme, S. & Govindwar, S. (2007). Decolourization of azo dye methyl red by *Saccharomyces cerevisiae* MTCC 463. *Chemosphere*, 68 (2), 394-400.
- Jafari, N., Kasra, R., Reza, M., Hossein, A. & Gharavi, S. (2012). Degradation of a textile reactive azo dye by a combined biological-photocatalytic process: *Candida tropicalis* Jks2-Tio2/Uv. *Journal of Environmental Health Sciences & Engineering*, 9 (33), 1-7.
- Jiang, H., Tay, J. & Tay, S. (2004). Changes in structure, activity and metabolism of aerobic granuls as a microbial response to high phenol loading. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 602-608.
- Kamilaki, A. (2000). The removal of reactive dyes from textile effluents: A bioreactor approach employing whole bacterial cells. (Tesis de Doctorado). Londres: Universidad de Leeds.
- Kandelbauer, A. & Guebitz, G. (2005). Bioremediation for the decolorization of textile dyes. En E. Lichfouse, J. Schwarbauer & D. Robert, *Environmental Chemistry* (pág. Capítulo 26). Alemania: Springer.
- Khadijah, O., Lee, K. & Mohd, F. (2009). Isolation, screening and development of local bacterial consortia with azo dyes decolourising capability. *Malaysian Journal of Microbiology*, 5(1): 25-32.
- Knackmuss, B. & Stolz, A. (2002). Molecular cloning and characterization of the gene coding for the aerobic azoreductase from *Xenophilus azovorans* KF46F. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(8): 3948–3955.
- Knobelsdorf, J. (14 de Julio de 2005). Eliminación biológica de nutrientes en un ARU de baja carga orgánica mediante el proceso VIP. Barcelona, España: Universidad Politécnica de Catalunya.
- Li, J. (2010). Functions of *Bacillus Subtilis* BS7.29 in wastewater treatment. *International Conference on Digital Manufacturing & Automation*. China: IEEE.
- Looi, N. (2009). *Bioremediation of textile wastewater using microclear*. Malasia: Universidad técnica de Malasia.

- Macola, S. (2010). *Universidad Técnica de Manabí*. Recuperado el 8 de Julio de 2013, de <http://www.sisman.utm.edu.ec/libros/microcap48>
- Manivannan, M., Reetha, D. & Ganesh, P. (2011). Decolourization of textile azo dyes by using bacteria isolated from textile dye effluent. *Journal of Ecobiotechnology*, 3(8): 29-32.
- Martin, A. (2002). Phylogenetic approaches for describing and comparing the diversity of microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (8): 3673–3682.
- Martínez, G., Perurena, M., Núñez, J., Fernández, C. & Bandera, F. (1997). Aislamiento, identificación y tipificación de levaduras en pacientes VIH positivos con candidiasis oral. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 49 (3): 174-180.
- Ministerio de salud del Perú. (2007). *Serie de normas técnicas No 44*. Recuperado el 8 de Julio de 2013, de <http://es.scribd.com/doc/13650507/Manual-PARA-LA-IDENTIFICACION-DE-HONGOS>
- Moncayo, I. (2010). Remoción de los colorantes textiles reactivos rojo 141, amarillo 84 y azul navy 171 eliminados en el agua residual, utilizando un inóculo compuesto seleccionado, bajo condiciones anaerobias a nivel de laboratorio. Tesis. Sangolquí: Escuela Politécnica Del Ejército.
- Montenegro, J. (2010). Evaluación de la disminución de concentración de fenol en agua sintética por medio de dos consorcios bacterianos nativos, aerobio y anaerobio facultativo, a nivel de laboratorio, para su aplicación futura en la biorremediación de efluentes textiles. Tesis. Sangolquí: Escuela Politécnica Del Ejército.
- Montoya, H. (2008). *Microbiología básica para el área de la salud y afines*. Colombia: Universidad de Antioquia.
- Mora, A., Chávez, C., Fonseca, G., Cabra, J. & Carmona, Y. (2005). Desarrollo de un inóculo microbiano empleando lodos activados para la remoción de ácido sulfúrico mediante biofiltración. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 7(2); 26-34.
- Muñoz, D. (2011). Diseño e implementación de una planta piloto para remoción de DQO de aguas residuales de la industria textil, utilizando el inóculo microbiano nativo I5. Sangolquí: ESPE.
- Murray, P., Rosenthal, K., & Pfaller, M. (2009). *Microbiología médica*. Barcelona-España: Elsevier.

- Neogen Corporation. (2013). *Acumedia dehydrated culture media*. Recuperado el 8 de Julio de 2013, de http://www.neogen.com/Acumedia/Product_List.asp
- Olukanni, O., Osuntoki, A. & Gbenle, G. (2006). Textile effluent biodegradation potentials of textile effluent-adapted and non-adapted bacteria. *African Journal of Biotechnology*, 5(20): 1980-1984.
- Organización Mundial del Comercio - OMC. (10 de abril de 2013). El comercio mundial en 2012 y perspectivas para 2013. Ginebra.
- Pacheco, F. (2009). Evaluación de la eficacia de la aplicación de inóculos microbiales y de *Eissenia fetida* en el proceso de compostaje doméstico de desechos urbanos. Navarra, España: Universidad De Navarra.
- Paladines, C. (2011). Evaluación de la capacidad de degradación microbiana de tensioactivos aniónicos a partir de dos consorcios microbianos removedores de colorantes reactivos, a nivel de laboratorio. Tesis. Sangolquí: Escuela Politécnica Del Ejército.
- Pearce, C., Lloyd, J. & Guthrie, J. (2003). The removal of colour from textile wastewater using whole bacterial cells: A review. *Elsevier*, 179-196.
- Pemán, J., Mazuelos, M. & Rubio, M. (2007). *Guía práctica de identificación y diagnóstico en micología clínica*. Bilbao. Obtenido de <http://www.guia.reviberoammicol.com/>
- Pereira, L., Coelho, A., Viegas, C., Correia, M., Robalo, M. & Martins, L. (2009). Enzymatic biotransformation of the azo dye Sudan Orange G with bacterial CotA-laccase. *Journal of Biotechnology*, 139, 68–77.
- Pérez, E., Ruiz, A. & Yeomans, H. (2004). Aislamiento, identificación y evaluación de un cultivo mixto de microorganismos con capacidad para degradar DDT. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 20(2): 69-75.
- Pertiwi, A. & Roosmini, D. (2010). Heavy metal (Cu, Cr and Zn) pollution profiles in surface water and sediments around textile industry PT X (Cikijing River). Institut Teknologi Bandung.
- Praveen, G. & Bhat, K. (2012). Decolorization of azo dye red 3BN by bacteria . *International Research Journal of Biological Sciences*, 1(5), 46-52.
- Rai, H., Bhattacharyya, M., Singh, J., Bansal, T., Purva, V. & Banerjee, U. (2005). Removal of dyes from the effluent of textile and dyestuff manufacturing industry: A review of emerging techniques with reference to biological treatment. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 35, 219-238.

- Ramya, M., Anusha, B. & Kalavanthy, S. (2008). Decolorization and biodegradation of indigo carmine by a textile soil isolate *Peanibacillus larvae*. *Biodegradation* , 19:28-291.
- Rittmann, B. & McCarty, P. (2001). *Biotecnología del medio ambiente, principios y aplicaciones*. Madrid: McGraw Hill.
- Rivadeneira, C. (Abril de 2013). Evaluación del comportamiento y estabilización aerobia del inóculo microbiano I5-microbiología ESPE en un reactor tipo flujo pistón de alimentación continua para el tratamiento a escala piloto de agua residual textil. Tesis. Sangolquí: Escuela Politécnica del Ejército.
- Rodríguez, P. (2011). Aislamiento e identificación de cepas microbianas como potenciales agentes para biorremediación de efluentes en una extractora de palma aceitera. Riobamba: Escuela Superior Politécnica del Chimborazo.
- Rodríguez, Z., Boucourt, R., Rodríguez, J., Albelo, N., Núñez, O. & Herrera, F. (2006). Aislamiento y selección de microorganismos con capacidad de degradar el almidón. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola* , 40(3): 349-354.
- Rosner, B. (2010). *Fundamentals of biostatistics*. Boston: Brooks/Cole.
- Russ, R., Rau, R. & Stolz, A. (2000). The function of cytoplasmic flavin reductases in the reduction of azo dyes by bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* , 66, 1429-1434.
- Salas, C. (2003). Tratamiento físico-químico de aguas residuales de la industria textil. *Revista Ingeniería Química* , 5(2): 73-80.
- Saranraj, P., Sumathi, V., Reetha, D. & Stella, D. (2010). Decolourization and degradation of direct azo dyes and biodegradation of textile dye effluent by using bacteria isolated from textile dye effluent. *Journal of Ecobiotechnology*, 2(7): 7-11.
- Saratale, R., Saratale, G., Chang, J. & Govindwar, S. (2009). Decolorization and biodegradation of textile dye Navy blue HER by *Trichosporon beigelii* NCIM-3326. *Journal of Hazardous Materials*, 166, 1421–1428.
- Saravanan, P., Pakshirajan, K. & Saha, P. (2008). Kinetics of phenol and m-cresol biodegradation by an indigenous mixed microbial culture isolated from a sewage treatment plant. *Journal of Environmental Sciences*, 20, 1508-1513.
- Secretaría de Ambiente. (2010). Marco Normativo. Obtenido de http://www.quitoambiente.gob.ec/web/index.php?option=com_k2&view=item&id=125%3Atexto-unificado-de-legislaci%C3%B3n-ambiental-secundaria-del-ministerio-de-ambiente-tulas&lang=es

- Snellinx, Z., Taghavi, S., Vangronsveld, J. & Van Der Lelie, D. (2003). Microbial consortia that degrade 2,4-DNT by interspecies metabolism: Isolation and characterization. *Biodegradation*, 14(1):19-29.
- Tотора, G., Funke, R. & Case, C. (2007). *Introducción a la microbiología*. Buenos Aires: Panamericana.
- Travis, E., Bruce, N. & Rosser, S. (2008). Short term exposure to elevated trinitrotoluene concentrations induced structural and functional changes in the soil bacterial community. *Environmental Pollution*, 153(2):432-439.
- Universidad de Granada - UGR. (2012). Técnicas de cultivo, aislamiento, obtención de cultivos puros. Granada, España. Obtenido de <http://www.pomif.com/pages/practicas/bacteriologia/aislamiento>
- Universidad de Idaho. (2012). *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Obtenido de uiweb: http://www.uiweb.uidaho.edu/micro_biology/250/IDFlowcharts.pdf
- Vargas, B., Ramos, J., Manzanero, L. & Rincones, M. (1992). Estudio de las comunidades bacterianas en un sistema de lodos activados. *Ecotrópicos*, 5(2): 1-10 .
- Velázquez, J. (Septiembre de 2005). Determinación de la comunidad microbiana en biorreactores mediante técnicas de biología molecular. México: Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.
- Walters, A., Santillo, D. & Johnston, P. (2005). *El tratamiento de textiles y sus repercusiones ambientales*. Reino Unido: Greenpeace.
- Wang, H., Zheng, X., Su, J., Tian, Y., Xiong, X. & Zheng, T. (2009). Biological decolorization of the reactive dyes Reactive Black 5 by a novel isolated bacterial strain *Enterobacter sp.* EC3. *Journal of Hazardous Materials*, 171, 654–659.
- Wertz, S., Degrange, V., Prosser, J., Poly, F., Commeaux, C., Guillaumaud, N. y otros. (2007). Decline of soil microbial diversity does not influence the resistance and resilience of key soil microbial functional groups following a model disturbance. *Environmental Microbiology*, 9(9):2211-2219.
- Yang, Q., Yang, M., Pritsch, K., Yediler, A., Hagn, A., Schlöter, M. y otros. (2003). Decolorization of synthetic dyes and production of manganese-dependent peroxidase by new fungal isolates. *Biotechnology Letters*, 25 (9), 709-713.
- Yoo, E., Libra, J. & Wiesmann, U. (2000). Reduction of azo dyes by *Desulfovibrio desulfuricans*. *Water Science and Technology*, 41(12):15–22.

Ziagova, M. & Liakopoulou, M. (2010). Comparative studies on the degradation of three aromatic compounds by *Pseudomonas sp.* and *Staphylococcus xylosus*. *Journal of environmental science and health*, 45(8):1017-25.