



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

Evaluación *in vitro* de la capacidad de remoción orgánica en efluentes de una planta procesadora de aceite de palma aplicando bacterias Gram negativas autóctonas.

Autora: Muñoz Gualotuña, Gabriela Alejandra

Director del proyecto: M.Sc. Vargas Verdesoto, Rafael Eduardo

Director externo del proyecto: Ing. Santana, Paúl

Sangolquí, 05 de Agosto del 2022



ÍNDICE DE CONTENIDOS



-  Introducción
-  Objetivos
-  Metodología
-  Resultados y discusión
-  Conclusiones
-  Recomendaciones
-  Agradecimientos



INTRODUCCIÓN

¿De dónde provienen los efluentes?



Procesamiento de aceite de palma



Palm Oil Mill Effluent (POME)



Sistema de Tratamiento Biológico



Acondicionamiento del efluente

- Laguna de enfriamiento

Lagunas de oxidación

- Anaerobias
- Aerobias



Lagunas Facultativas

INTRODUCCIÓN

Vertido directo



Obstrucción en el suelo

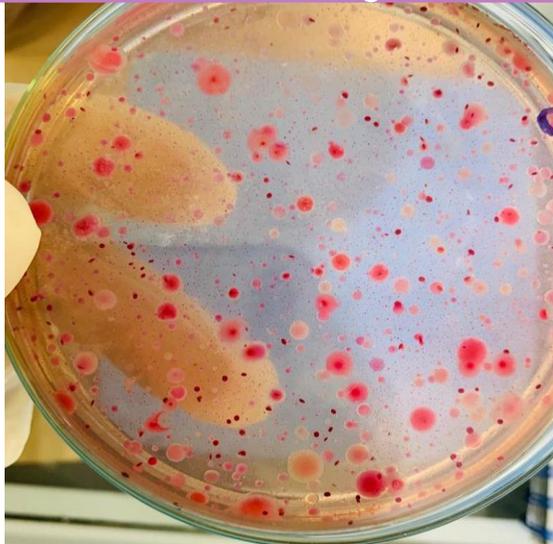


Daño en la vegetación

Contaminación del agua



Uso de microorganismos



VENTAJAS

Bajo coste

Efectivas

Garantiza seguridad



Objetivo General

Evaluar *in vitro* la capacidad de remoción orgánica en efluentes de una planta procesadora de aceite de palma aplicando bacterias Gram negativas autóctonas.

Objetivos Específicos



Efectuar la caracterización fisicoquímica del agua residual proveniente del proceso de extracción de aceite de palma, mediante análisis de la Demanda Química de Oxígeno (DQO), Oxígeno Disuelto (OD), Potencial de Hidrógeno (pH), Temperatura (T), Sólidos Totales (ST), Aceites y grasas (AG).



Aislar e identificar las bacterias Gram negativas autóctonas presentes en el sistema de tratamiento de efluentes a través de medios de cultivo selectivos y pruebas bioquímicas.

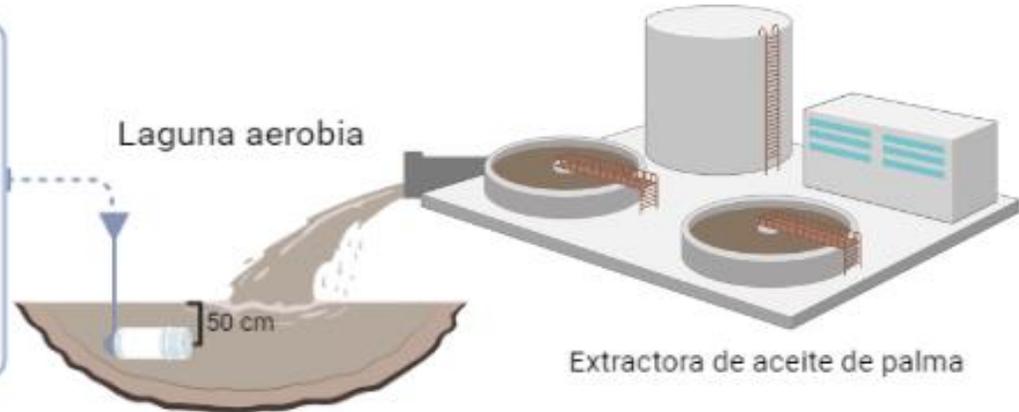


Evaluar *in vitro* la capacidad de remoción orgánica en el agua residual aplicando bacterias Gram negativas autóctonas, mediante análisis de la Demanda Química de Oxígeno (DQO).

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo

Caracterización fisicoquímica



Etiquetado de muestras	
Proyecto:	Tesis bacterias
ID muestra:	L-12
Lugar:	Salida L-12
Fecha:	22/11/2021
Hora:	11:10 a.m.
Muestreado por:	Gabriela Muñoz

Nota: Etiqueta diseñada al efecto de monitoreo de aguas residuales.



N° Laguna: Fase
L1: Anaerobia
L2: Acidogénica
L3: Metanogénica
L4: Metanogénica
L5: Metanogénica
L6: Facultativa
L7: Facultativa
L8: Facultativa
L9: Aerobia
L10: Aerobia
L11: Aerobia
L12: Aerobia
Río: Aerobia



Caracterización fisicoquímica

pH Temperatura

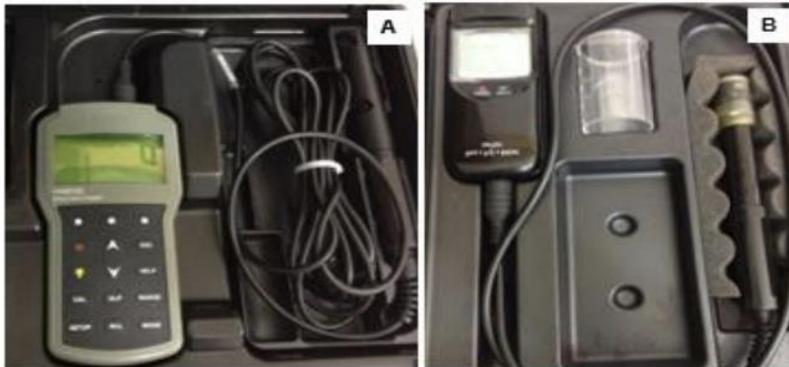


IN SITU

Oxígeno Disuelto



Figura 2 Equipos utilizados para la medición in situ de pH, T, y OD.



Nota: A: Oxímetro, marca HANNA modelo HI914301.
B: pH metro, HANNA modelo HI914300.

Sólidos totales



$$\text{Sólidos totales } \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}}\right) = (A - B) \times 20000$$

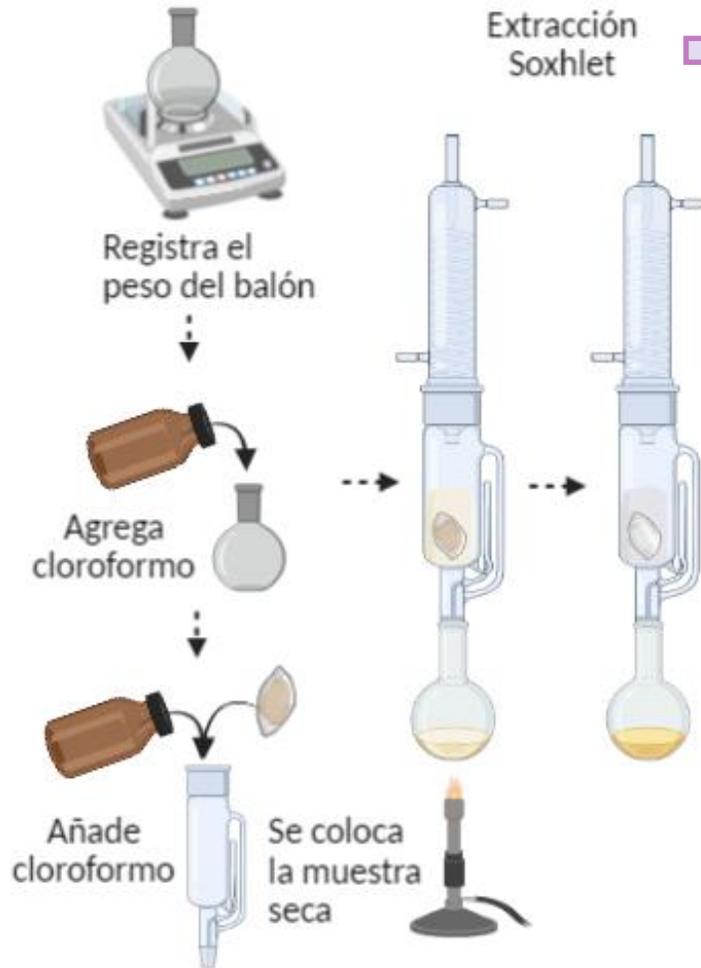
A = Peso cápsula + papel filtro + muestra seca (mg)

B = Peso cápsula + papel filtro (mg)



Caracterización fisicoquímica

Aceites y grasas



$$\text{Aceites y grasas } \left(\frac{mg}{L}\right) = (A - B) \times 20000$$

$A = \text{Peso balón + aceite (mg)}$

$B = \text{Peso balón vacío (mg)}$

$$DQO \left(\frac{mg}{L}\right) = \text{Lectura del colorímetro} \times F_d$$

$$DQO \left(\frac{mg}{L}\right) = \text{Lectura del colorímetro} \times \frac{100}{\text{Muestra diluí.}}$$

F_d : Factor de dilución.

Demanda química de oxígeno



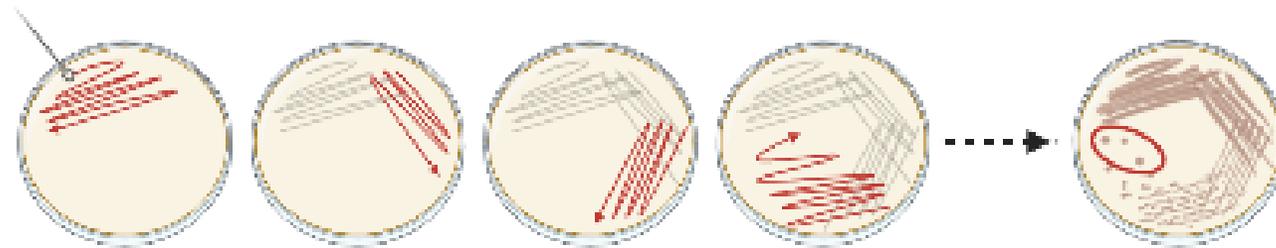
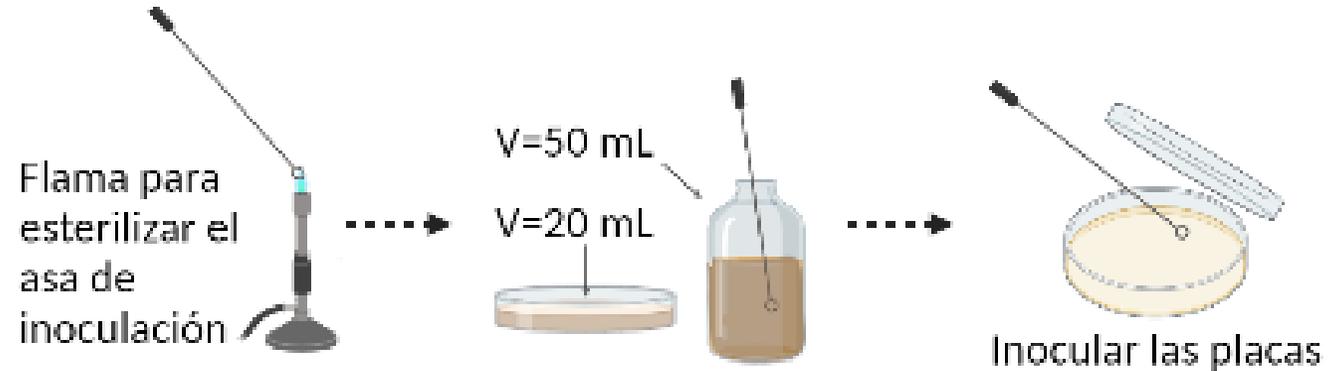
MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento

Muestreo



Procesamiento de las muestras



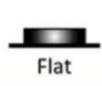
Procedimiento de inoculación (el asa se traza por estrías)

Formación de colonias diferenciadas

MATERIALES Y MÉTODOS

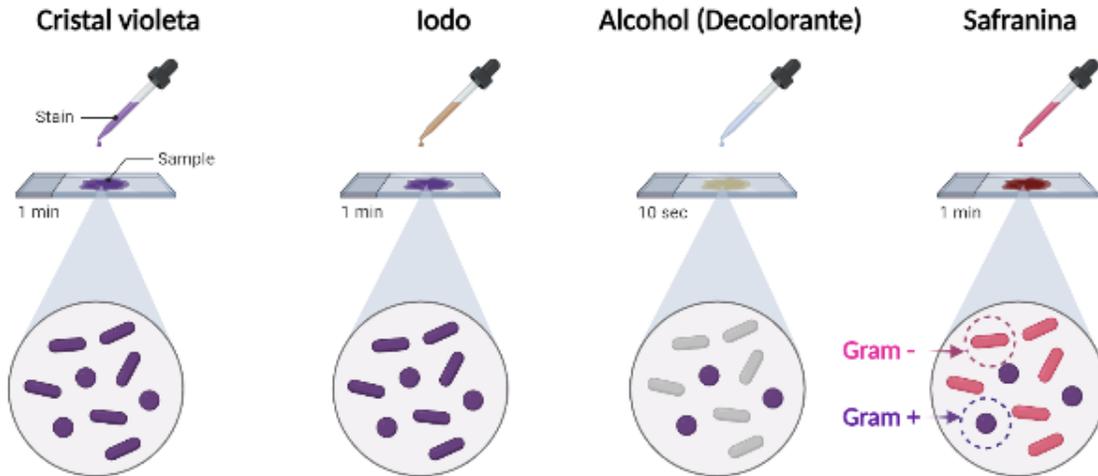
Identificación

Descripción Macroscópica

Forms of the Bacterial Colony	Shape	 Circular	 Punctiform	 Irregular	 Filamentous	 Rhizoid	 Spindle	
	Elevation	 Raised	 Convex	 Flat	 Umbonate	 Crateriform	 Pulvinate	
	Margin	 Entire	 Undulate	 Filiform	 Curled	 Lobate	 Erose	

Descripción Microscópica

Bacterias Gram negativas



Caracterización bioquímica



Urea

TSI

Citrato

SIM (Motilidad)



Catalasa



Evaluación *in vitro* de la capacidad de remoción orgánica

Bio aumentación de bacterias



Ensayo *in vitro*



Añade al efluente las bacterias

Temperatura, pH

Análisis DQO

Lectura viales

Software

Recopilación de datos  Microsoft Excel

Creación de gráficos  GraphPad  bio RENDER

Análisis estadístico  InfoStat

Porcentaje de Reducción de la DQO

$$\% R - DQO = \frac{DQO_i - DQO_f}{DQO_i} \times 100 \quad (6)$$

DQO_i : valor inicial de la Demanda Química de Oxígeno.

DQO_f : valor final de la Demanda Química de Oxígeno.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización fisicoquímica

Calidad

Tiempo de extracción



NORMA DE CALIDAD AMBIENTAL Y DE DESCARGA DE EFLUENTE: RECURSO AGUA

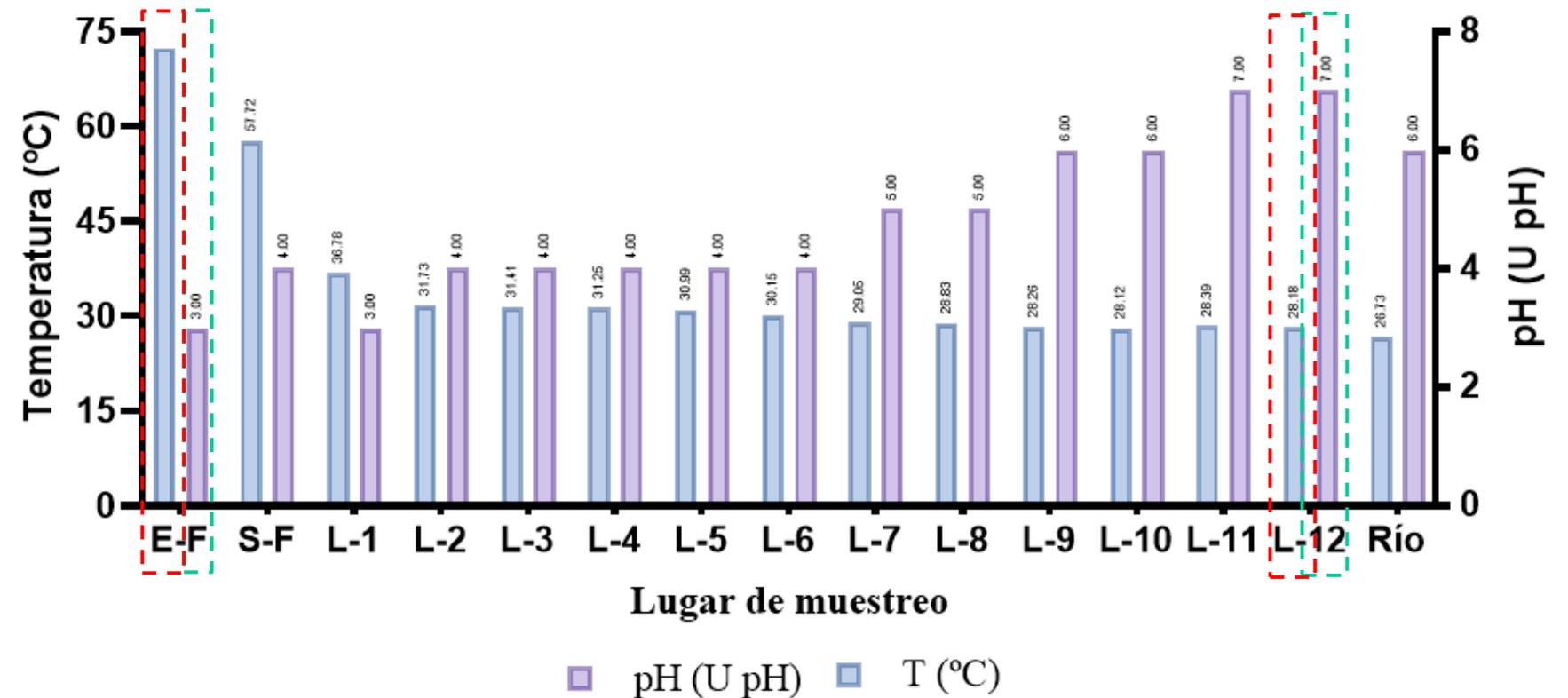
pH: 6-9

T: < 35° C

Potencial de hidrógeno

Temperatura

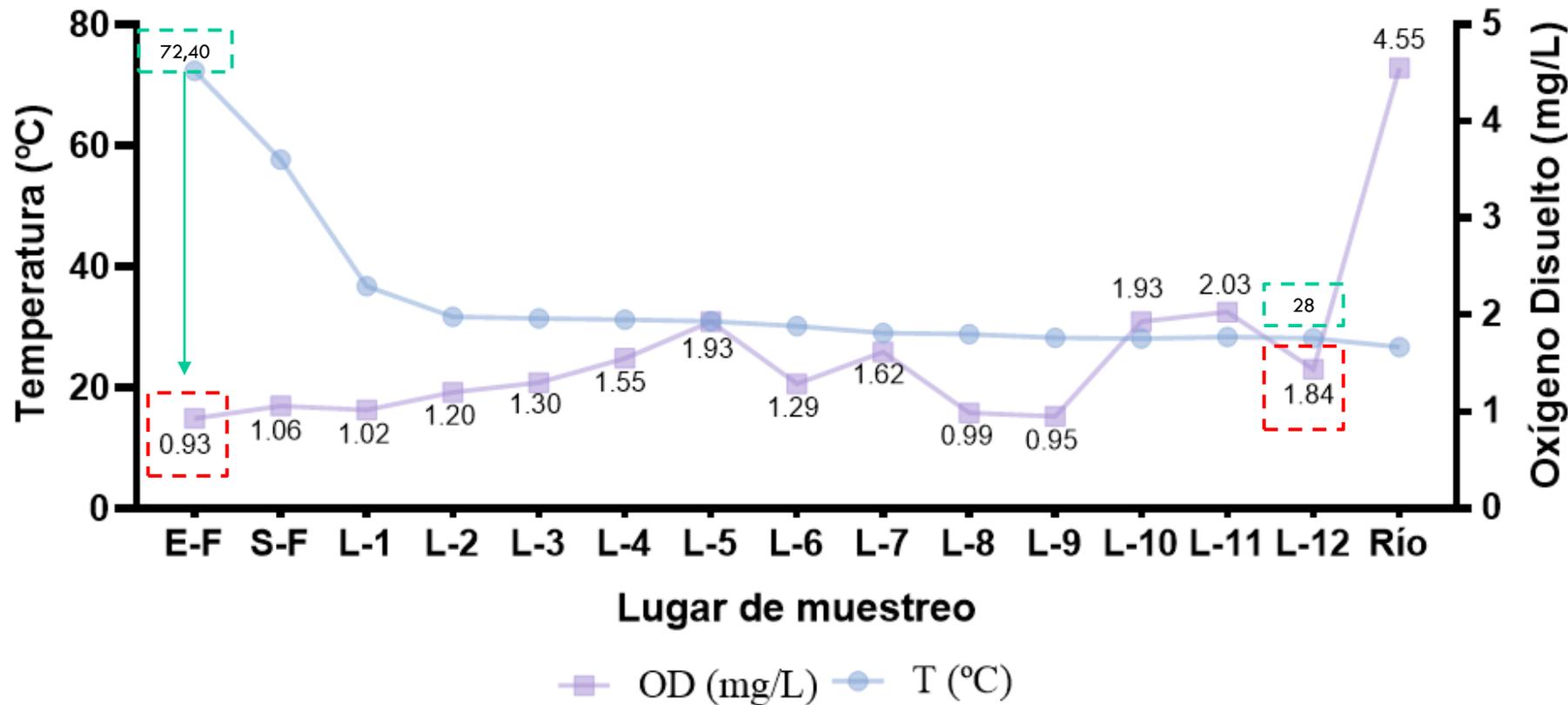
Datos promedio de T y pH, determinados en el tratamiento de efluentes durante cinco meses



Caracterización fisicoquímica

Oxígeno Disuelto

Concentración de Oxígeno Disuelto vs Temperatura, en el tratamiento de efluentes



Reducción de la solubilidad del OD

FACTORES

Presencia de sedimentos

Temperatura

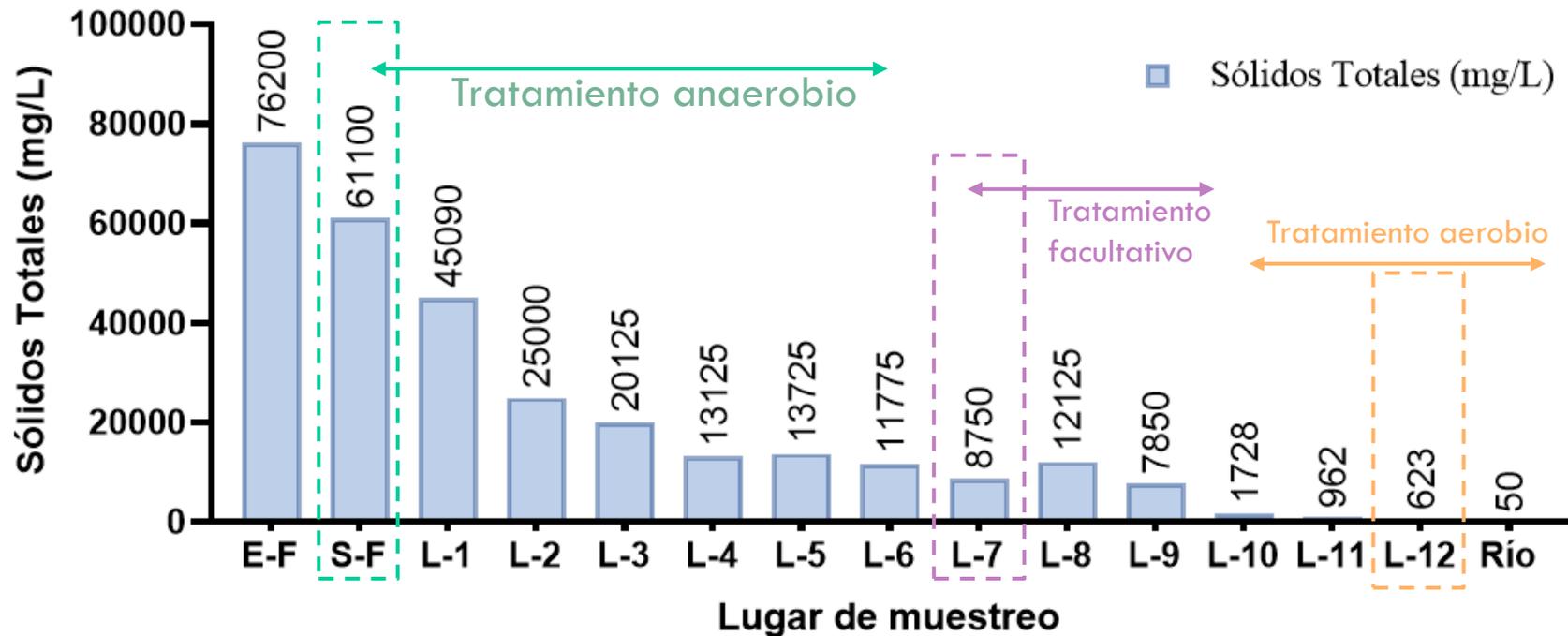
Exceso de patógenos

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización fisicoquímica

Sólidos totales

Sólidos Totales en el tratamiento de efluentes



NORMA DE CALIDAD AMBIENTAL Y DE DESCARGA DE EFLUENTE: RECURSO AGUA

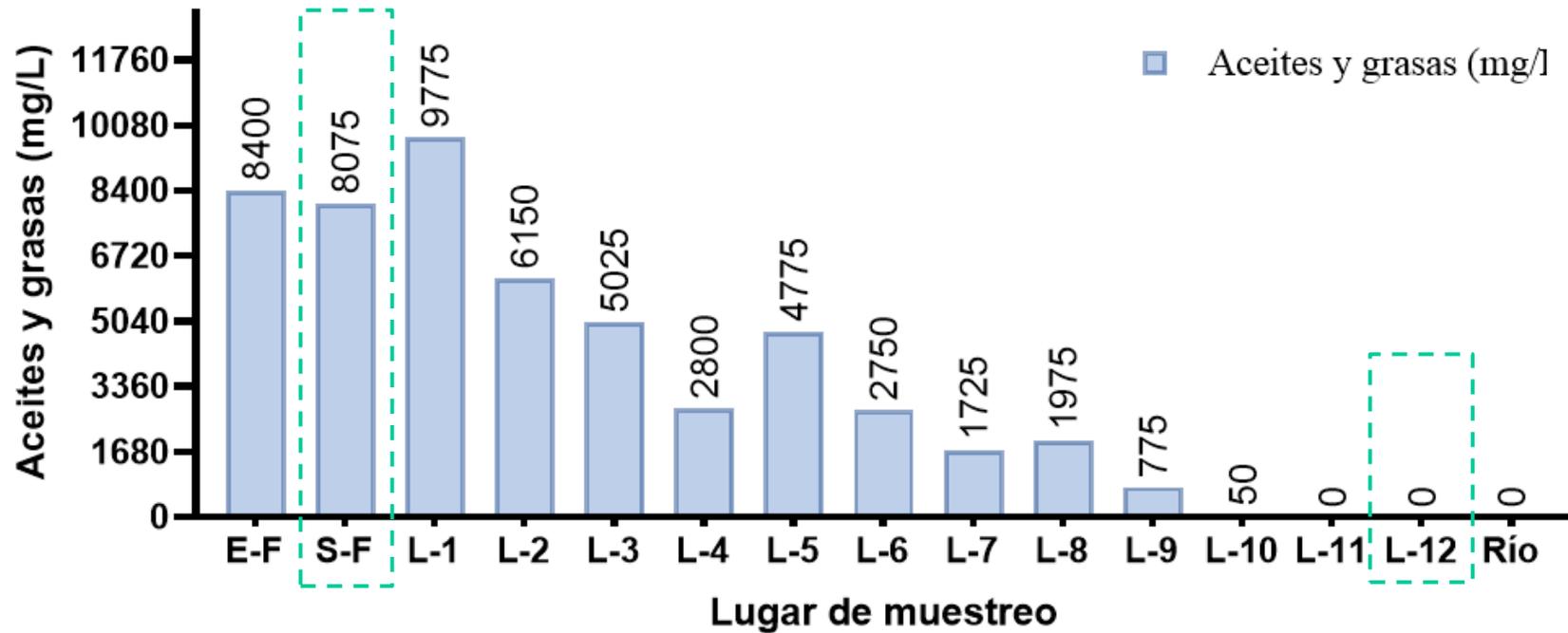
ST: 1600 mg/L

Sí Cumple

Caracterización fisicoquímica

Aceites y grasas

Aceites y grasas en el tratamiento de efluentes



**NORMA DE CALIDAD
AMBIENTAL Y DE
DESCARGA DE EFLUENTE:
RECURSO AGUA**

AG: 30 mg/L

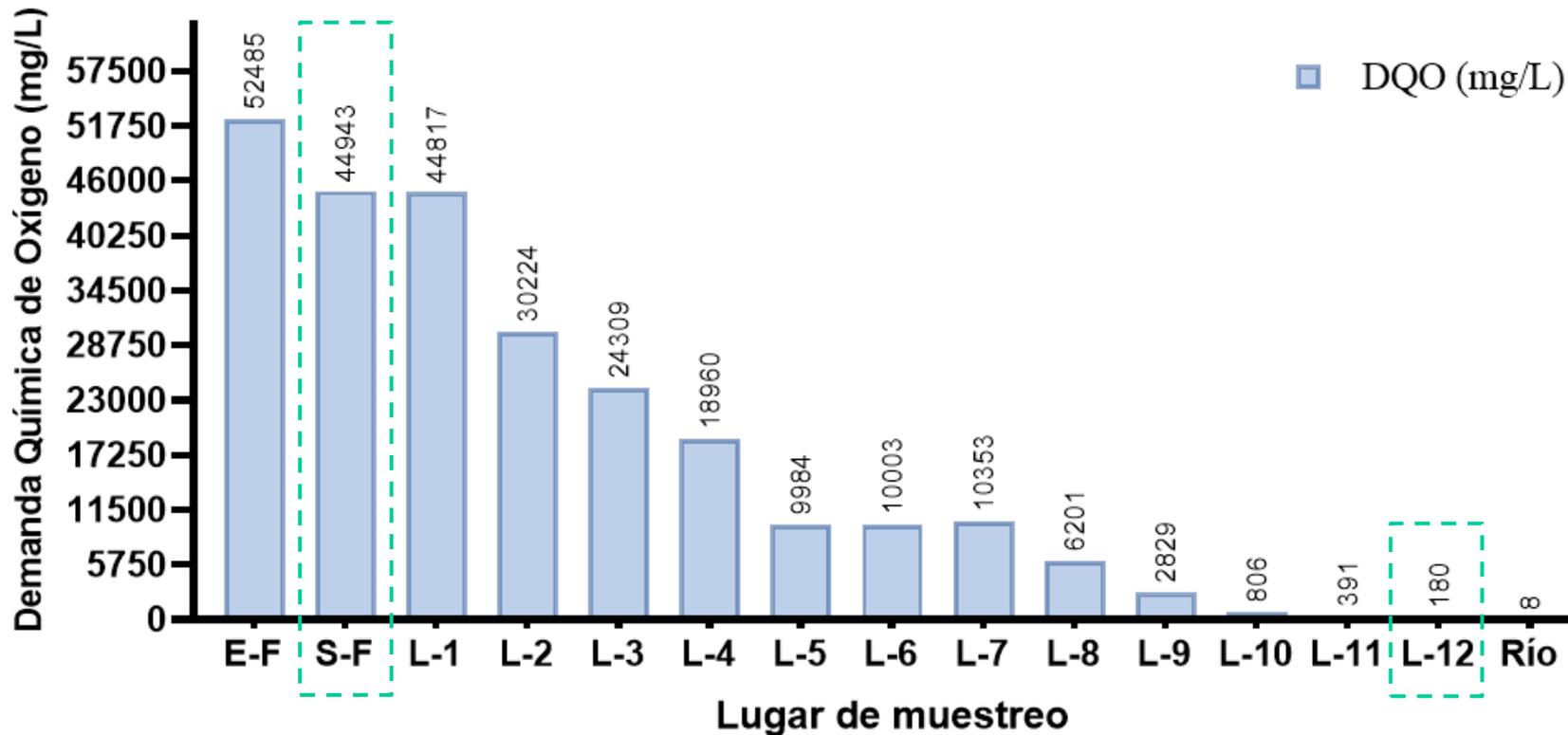
Sí Cumple

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización fisicoquímica

Demanda química de oxígeno

Demanda Química de Oxígeno en el tratamiento de efluentes



NORMA DE CALIDAD AMBIENTAL Y DE DESCARGA DE EFLUENTE: RECURSO AGUA

DQO: 200 mg/L

Sí Cumple

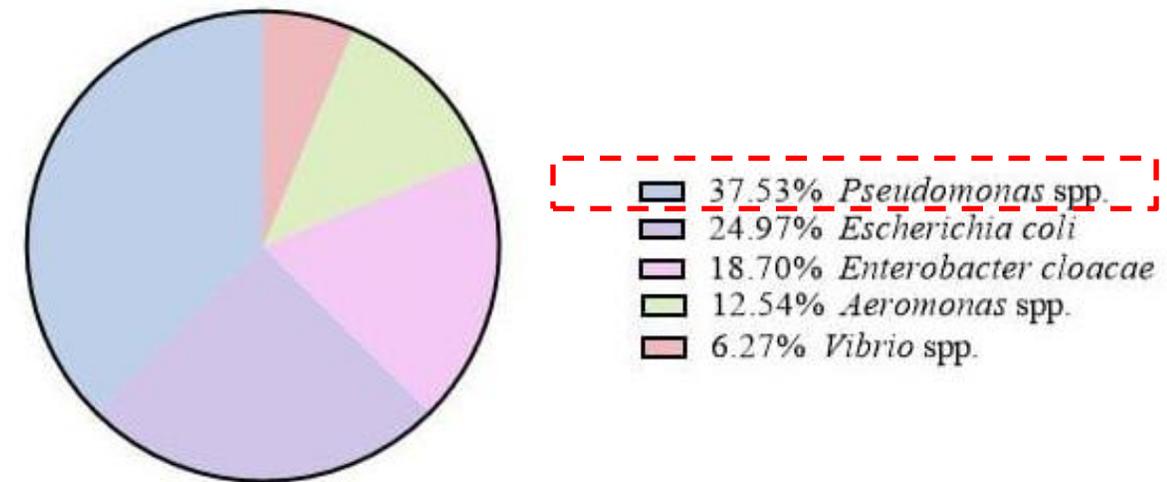
Aislamiento e identificación bioquímica

Tabla 8 Número de aislados de Bacterias y Levaduras, obtenidos en los medios sólidos, a partir de las muestras de la laguna facultativa L-8.

Muestras	Potencial de Hidrógeno (pH)	Levaduras	Bacilos Gram -	Total
<i>Muestras líquidas</i>				
EntL8a-L	4,98	1 aislamientos	2 aislamientos	
EntL8b-L	5,12	1 aislamientos	2 aislamientos	
SalL8c-L	5,47		5 aislamientos	
SalL8d-L	6,45	1 aislamientos	2 aislamientos	
Total		3	10	13
<i>Muestras sólidas</i>				
EntL8a-S	5,47		3 aislamientos	
EntL8b-S	6,45	1 aislamientos	2 aislamientos	
SalL8c-S	5,27		1 aislamientos	
SalL8d-S	5,50	1 aislamientos	1 aislamientos	
Total		2	6	8

Nota: aislamientos obtenidos de muestras sólidas y líquidas inoculados en medios agar Mac Conkey, agar XLD y agar nutriente. *Fuente:* Gabriela Muñoz

Figura 14 Porcentaje de Bacterias Gram negativas aisladas de la Laguna Facultativa N8, perteneciente al POME



Bala, Lalung, y Ismail (2014), reportaron:

Bacillus subtilis, *Clostridium spp.*, *Streptococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Flavobacterium spp.*, y *Cellulomona ssp.*

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación *in vitro* de capacidad de remoción orgánica

Pre-ensayo



Selección del volumen



Escherichia coli



Figura 21 Comportamiento de la DQO, antes y después de la aplicación de diferentes volúmenes (0,3, 5, 8) mL de la bacteria *Escherichia coli*.

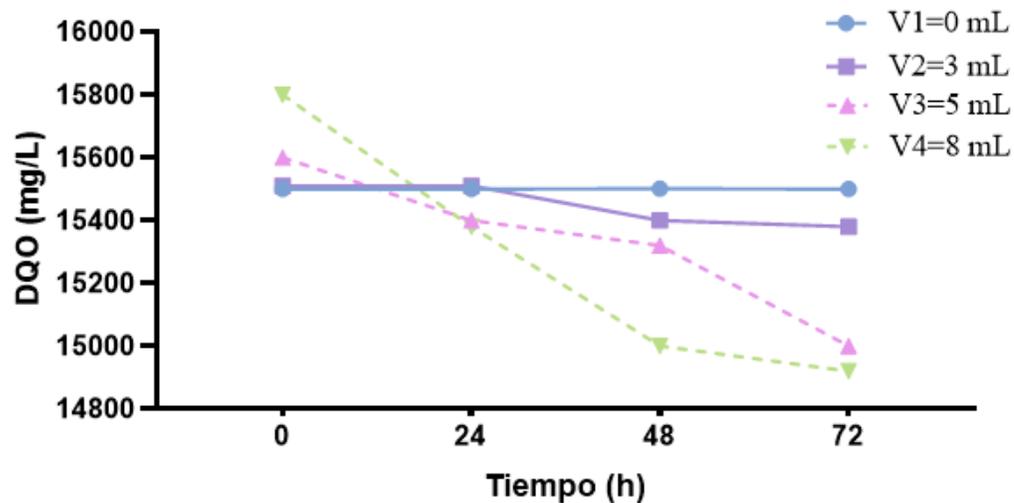
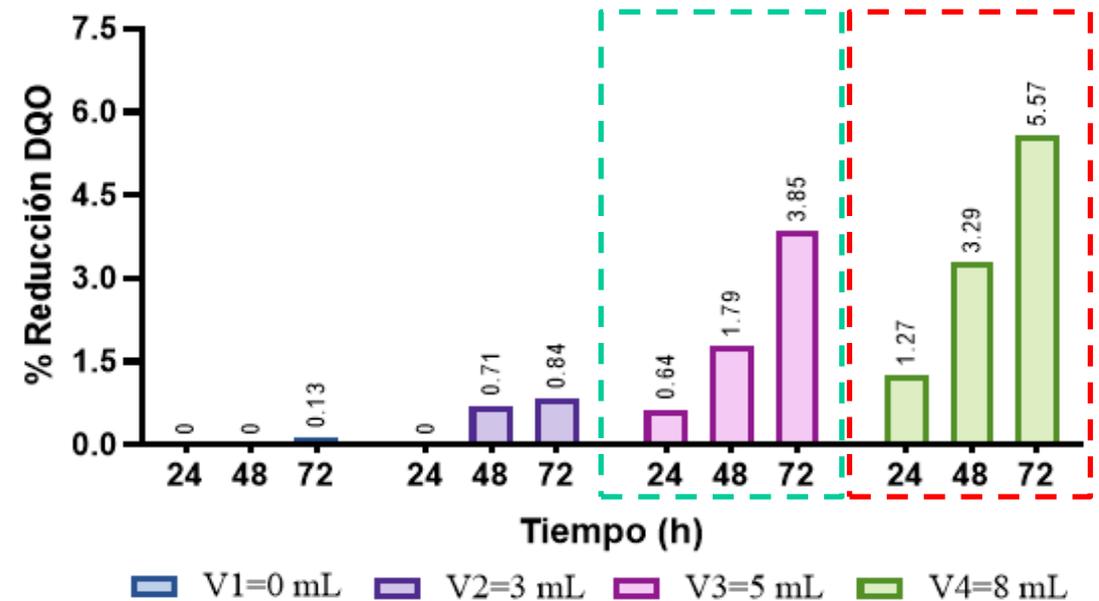


Figura 22 Porcentaje de reducción del DQO, después de la aplicación de diferentes volúmenes (3, 5, 8) mL de *Escherichia coli*, evaluado en cuatro tiempos (0, 24, 48, 72) h.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación *in vitro* de capacidad de remoción orgánica

Cepas utilizadas

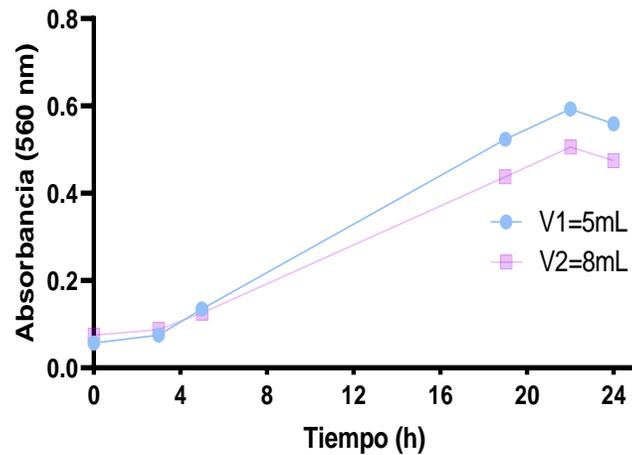
5

Pseudomonas spp.

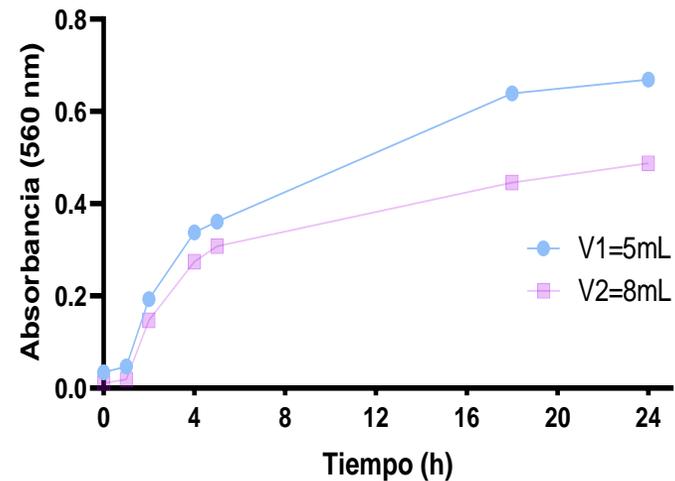
Escherichia coli

Enterobacter cloacae

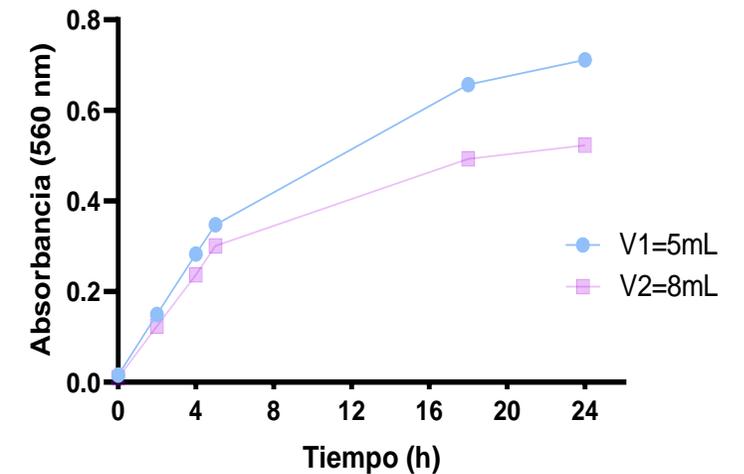
Curva de crecimiento de *Pseudomonas* spp.



Curva de crecimiento de *Escherichia coli*



Curva de crecimiento de *Enterobacter cloacae*



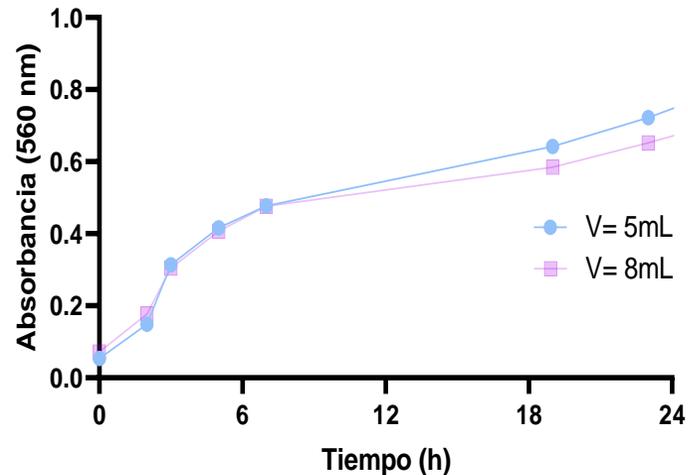
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación *in vitro* de capacidad de remoción orgánica

Cepas utilizadas

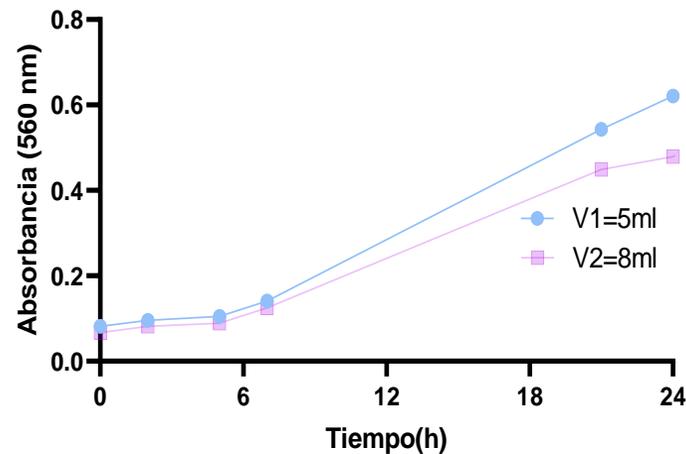
Aeromonas spp.

Curva de crecimiento de *Aeromonas* spp.



Vibrio spp.

Curva de crecimiento de *Vibrio* spp.



Parámetros ambientales

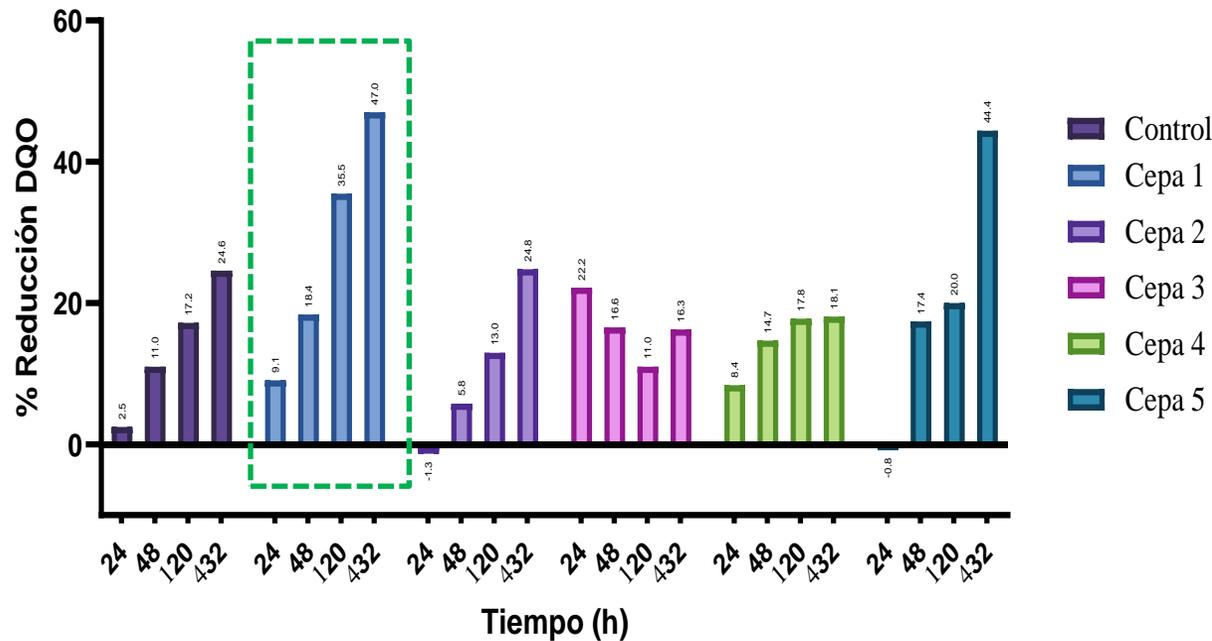
Cepa N°	V (mL)	Parámetro	Tiempo (h)				
			0	24	48	120	432
Control	5	T [°C]	28,83	26,53	26,76	25,84	26,99
		pH	4,84	4,8	4,9	4,98	4,88
	8	T [°C]	26,69	26,92	26,42	25,51	26,38
		pH	4,25	4,3	4,54	4,78	4,79
Cepa 1	5	T [°C]	27,65	26,1	26,85	26	26,01
		pH	4,69	4,93	5,04	5,09	5,1
	8	T [°C]	27,3	26,1	26	26	26,01
		pH	4,8	4,88	5,01	5,03	5,04
Cepa 2	5	T [°C]	26,5	26	26,4	26	26,01
		pH	4,1	4,26	4,55	4,95	4,96
	8	T [°C]	26,65	26,1	26	26	26,01
		pH	4,5	4,44	4,86	5,01	5,02
Cepa 3	5	T [°C]	27,65	26,1	26,4	26	26,01
		pH	4,34	4,3	4,55	4,95	4,96
	8	T [°C]	27,45	26,1	26	26	26,01
		pH	4,5	4,69	4,86	5,01	5,02
Cepa 4	5	T [°C]	27,75	25,6	26,2	26,1	26,11
		pH	4,67	4,63	4,82	4,9	4,91
	8	T [°C]	27,5	25,45	27,4	26,2	26,21
		pH	4,95	5,02	5,04	5,13	5,14
Cepa 5	5	T [°C]	31,98	28,23	26,85	25,9	25,91
		pH	4,51	4,45	4,56	4,82	4,83
	8	T [°C]	31,75	28,28	27,1	25,5	25,51
		pH	4,46	4,44	4,66	4,78	4,79

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

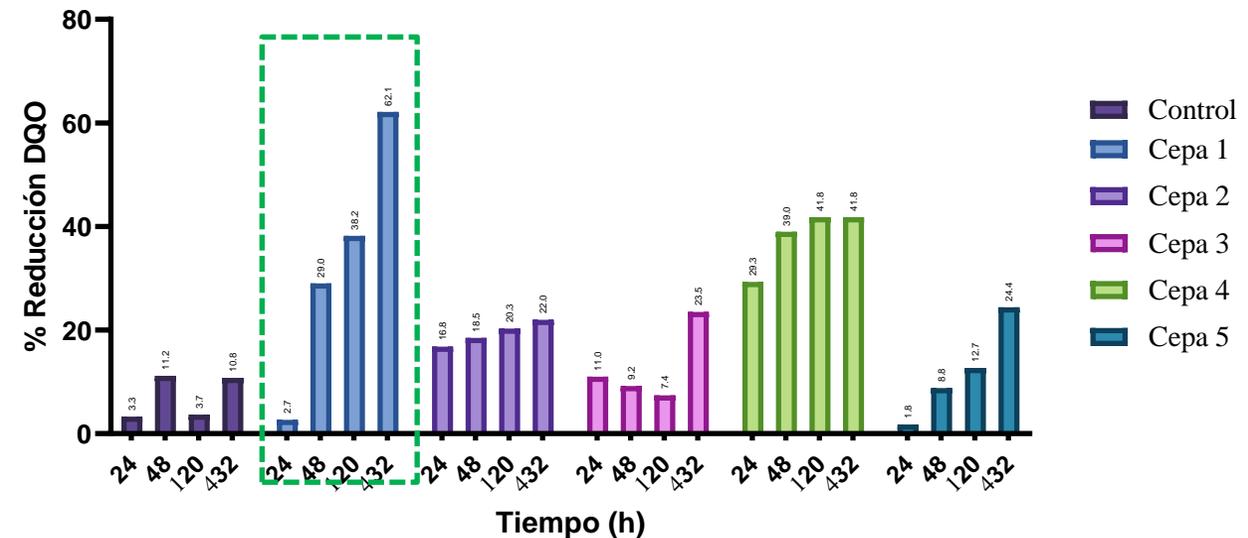
Evaluación *in vitro* de capacidad de remoción orgánica

Porcentaje de reducción de Demanda química de oxígeno

Porcentaje de reducción del DQO después de aplicar las cepas bacterianas -
Tratamiento A (5 mL)



Porcentaje de reducción del DQO después de aplicar las cepas bacterianas -
Tratamiento B (8 mL)



Análisis estadístico

ANOVA

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
%DQO	120	0,99	0,98	12,93

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	24687,18	59	418,43	102,97	<0,0001
Cepa	3113,26	5	622,65	153,23	<0,0001
Volumen	385,21	1	385,21	94,80	<0,0001
Tiempo	13612,71	4	3403,18	837,50	<0,0001
Cepa*Volumen	1964,51	5	392,90	96,69	<0,0001
Cepa*Tiempo	4057,65	20	202,88	49,93	<0,0001
Volumen*Tiempo	110,34	4	27,58	6,79	0,0001
Cepa*Volumen*Tiempo	1443,50	20	72,18	17,76	<0,0001
Error	243,81	60	4,06		
Total	24930,99	119			

H₀: Las bacterias Gram negativas autóctonas aisladas y aplicadas *in vitro*, no remueven la carga orgánica presente en el efluente proveniente de la planta procesadora de aceite de palma.

H₁: Las bacterias Gram negativas autóctonas aisladas y aplicadas *in vitro*, remueven la carga orgánica presente en el efluente proveniente de la planta procesadora de aceite de palma.

p valor es menor α ($0,001 < 0,05$)

Análisis estadístico

TEST DE DUNCAN

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 4,0635 gl: 60

Cepa	Medias	n	E.E.	
Control	11,63	20	0,45	A
Cepa 3	11,74	20	0,45	A
Cepa 2	11,99	20	0,45	A
Cepa 5	12,86	20	0,45	A
Cepa 4	21,09	20	0,45	B
Cepa 1	24,22	20	0,45	C

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 4,0635 gl: 60

Volumen	Medias	n	E.E.	
5	13,79	60	0,26	A
8	17,38	60	0,26	B

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 4,0635 gl: 60

Tiempo	Medias	n	E.E.	
0	0,00	24	0,41	A
24	8,75	24	0,41	B
48	16,88	24	0,41	C
120	21,02	24	0,41	D
432	31,28	24	0,41	E

Interacción

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 4,0635 gl: 60

Cepa	Volumen	Tiempo	Medias	n	E.E.	
Control	5	432	24,65	2	1,43	
Cepa 2	5	432	24,85	2	1,43	O P
Control	8	432	26,25	2	1,43	O P Q
Cepa 1	8	48	29,05	2	1,43	P Q R
Cepa 4	8	24	29,25	2	1,43	Q R
Cepa 1	5	120	35,50	2	1,43	R
Cepa 1	8	120	38,25	2	1,43	S
Cepa 4	8	48	39,00	2	1,43	S T
Cepa 4	8	120	41,80	2	1,43	S T
Cepa 4	8	432	41,85	2	1,43	T U
Cepa 5	5	432	44,40	2	1,43	T U
Cepa 1	5	432	47,00	2	1,43	U W
Cepa 1	8	432	62,10	2	1,43	U W X

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Se efectuó la caracterización fisicoquímica del agua residual proveniente del proceso de extracción de aceite de palma, logrando obtener resultados de Potencial de Hidrógeno (pH) de 7.2 U pH, Temperatura (T) de 28.2 °C, Oxígeno Disuelto (OD) con un valor de 1.84 mg/L, Sólidos Totales (ST) de 623 mg /L, Aceites y grasas (AG) de 0 mg/L, y Demanda Bioquímica de Oxígeno (DQO) con 180 mg/L, valores que cumplen con la norma de calidad ambiental.

Se aislaron cinco cepas bacterianas Gram negativas de la laguna facultativa L-8: *Pseudomonas* spp. en un porcentaje de 37.53%; *Escherichia coli* en un porcentaje de 24.97%; *Enterobacter cloacae* 18.70%; *Aeromonas* spp. 12.54%; y *Vibrio* spp. 6.27%

Mediante la evaluación *in vitro* de la capacidad de remoción orgánica en el agua residual industrial aplicando bacterias Gram negativas autóctonas como *Pseudomonas* spp., *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Aeromonas* spp. y *Vibrio* spp., con un volumen de 5 mL en un tiempo de 432 h, se logró una disminución de la DQO con porcentajes de remoción de 46.5%, 36.9%, 16.35%, 18.1%, 44.4% correspondientemente, y con un volumen de 8 mL en un tiempo de 432 h, se consiguió una disminución de la DQO con porcentajes de remoción de 62.1%, 22.0%, 23.5%, 41.9%, 24.3% respectivamente.

Los resultados del análisis estadístico muestran que la aplicación de *Pseudomona* spp., en un volumen de 8 mL evaluado en un tiempo de 432 h, resulto ser el tratamiento que logró mayor remoción orgánica con un porcentaje de 62.1%

El mejor tratamiento (Cepa 1: *Pseudomona* spp.) obtenido en la evaluación *in vitro* de remoción orgánica mediante el análisis de la DQO mostro valores de pH entre 5.01-5.4 (U pH) y una temperatura de 26.01°C.

RECOMENDACIONES

Se recomienda efectuar inóculos mixtos en diferentes combinaciones, con el fin de optimizar el rendimiento en la remoción orgánica y obtener mayores tasas de reducción de la DQO.

Se recomienda implementar el estudio de DBO_5 , mismo que es utilizado para cuantificar la contaminación del agua por la presencia de materia orgánica biodegradable, qué al poseer valores de DQO y DBO_5 , se podría calcular el índice de biodegradabilidad de las aguas residuales industriales.

Se recomienda desarrollar otras investigaciones con las cepas aisladas para determinar su eficiencia y capacidad de biorremoción de otros tipos de contaminantes.

AGRADECIMIENTOS



Rafael Eduardo Vargas Verdesoto, Ing.,M.Sc.
Tutor

Lourdes Karina Ponce Loaiza B. Sc., M.Sc.
Co tutora



Paúl Santana Macias, Ing.
**Asesor externo del proyecto
de titulación**

FAMILIA y AMIGOS

GRACIAS



ESPE
ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO
CAMINO A LA EXCELENCIA