



FACULTAD DE INGENIERÍAS Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

BIORREMEDIACIÓN DE AGUAS RESIDUALES CON ALTA SALINIDAD
MEDIANTE BACTERIAS HALÓFILAS AISLADAS DE PERFILES COSTEROS
DE ECUADOR

“Trabajo de Titulación presentado en conformidad a los requisitos establecidos para optar por el título de Ingeniero Ambiental en Prevención y Remediación”.

Profesor Guía

Ing. Carlos Luis Banchón Bajaña

Autor

Tomas David Villota Meza

Año

2014

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con el estudiante, orientando sus conocimientos para un adecuado desarrollo del tema escogido, y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación.”

Carlos Luis Banchón Bajaña

Ingeniero

C.I.: 091805918-9

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes”.

Tomas David Villota Meza

C.I.: 171900624-7

AGRADECIMIENTO

A mis padres por su esfuerzo, dedicación y cariño. A mis hermanos por su apoyo Incondicional. Al Ingeniero Carlos Banchón por guiarme en este proyecto. Al personal de todos los laboratorios de la Universidad por su ayuda en este tiempo.

DEDICATORIA

Con todo mi cariño a mis padres y hermanos, por ser una fuente de inspiración a diario. A todos los familiares y amigos que me acompañaron en esta etapa.

RESUMEN

La industria pesquera en el Ecuador es un sector de gran importancia para la generación de ingresos económicos para el país. Las aguas residuales de esta industria se caracterizan por la presencia de sales, la cual es causa de problemas en el tratamiento.

En el presente estudio se realiza un tratamiento para aguas residuales con una concentración de sal (NaCl) del 2% mediante el uso de bacterias halófilas aerobias, que fueron aisladas de diferentes puntos de muestreo del perfil costero.

El aislamiento de bacterias abarca la toma de las muestras de agua en fuentes naturales, la creación de mapas georreferenciados con los datos de cada uno de los puntos, la realización de medios de cultivo para encontrar una fórmula en la que exista la mayor presencia de bacterias, el aislamiento de las bacterias y su uso en el tratamiento de agua residual con alta salinidad.

El experimento de biorremediación fue realizado a escala de laboratorio, con agua residual sintética diseñada para simular las condiciones de salinidad y carga orgánica de la industria pesquera.

El principal problema encontrado en el tratamiento por la presencia de salinidad fue la falta de sedimentación al final del mismo, problema que fue resuelto con un tratamiento terciario a base del uso de coagulante y floculante químico.

Entre los resultados obtenidos más importantes se encuentran la determinación de la fórmula con mayor crecimiento bacteriano y el resultado de los análisis del agua contaminada y tratada.

ABSTRACT

The fishing industry in Ecuador is a very important sector for the generation of economic income. The industry's wastewater is characterized by the presence of salts, which causes problems in the treatment.

In the current research, a treatment for wastewater takes place. The water has a salt (NaCl) concentration of 2%. The research is carried out by the use of aerobic halophilic bacteria, which were isolated from different sampling points of the coastal profile.

The isolation of bacteria involves the taking of water samples from natural sources, the creation of geo-referenced maps including data of every point, the carrying out of culture media, with the objective of finding a formula with the largest presence of bacteria, bacteria isolation and its use in wastewater treatment with high salinity.

The bio-remediation experiment was executed at a laboratory scale, with synthetic wastewater, designed for simulating the conditions of salinity and organic load of the fishing industry.

The main problem found in the treatment due to the salinity presence was the lack of sedimentation at the end of it. This problem was solved with a tertiary treatment, with the use of coagulants and flocculant chemicals.

Among the most relevant results, there is the determination of the formula with the highest bacterial growth, and the result of the polluted- treated water analysis.

Among the most important findings in the study were the determination of the best formula for bacterial growth and the result of the parameters measured in the treated water.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1.ASPECTOS GENERALES	3
1.1 Actualidad de la generación de desechos en la industria pesquera	3
1.2 Propuesta de tratamiento de aguas residuales de industriales pesqueras	4
2.MARCO TEÓRICO	5
2.1 Procesos de biorremediación de aguas residuales salinas.....	5
2.2 Uso de bacterias para la biorremediación	6
2.2.1 Uso de bacterias halófilas para la biorremediación	6
2.3 Aguas residuales con alta salinidad	8
2.3.1 Industria alimenticia	8
2.3.2 Industria petroquímica	9
2.3.3 Industria de curtiembre	9
2.4 Tecnologías de tratamiento de aguas residuales con alta salinidad	10
2.4.1 Técnicas térmicas	10
2.4.2 Coagulación - floculación.....	10
2.4.3 Intercambio iónico.....	11
2.4.4 Técnicas de membrana	11
2.4.5 Bacterias aerobias	11
2.5 Aislamiento de bacterias halófilas	12
2.5.1 Usos de las bacterias halófilas	12

3.METODOLOGÍA.....	14
3.1 Toma de muestras de aguas de mar del perfil costero ecuatoriano	16
3.2 Georreferenciación de puntos de muestreo mediante gps	19
3.3 Aislamiento de microorganismos halófilos mediante enriquecimiento	21
3.3.1 Aislamiento de bacterias en medio sólido mediante estriado	21
3.3.2 Aislamiento de halófilos aplicando un diseño factorial fraccionado Plackett-Burman	23
3.3.3 Crecimiento de bacterias en medio líquido	26
3.4 Crecimiento bacteriano por tipo de muestra	27
3.5 Determinación de la actividad proteolítica mediante digestión con caseína	27
3.6 Preparación del agua residual y el proceso de biorremediación	29
3.7 Microorganismos halófilos para biorremediación.....	31
3.8 Bioremediación de aguas residuales	32
3.8.1 Coagulación – floculación de agua residual producto de la biorremediación	33
3.9 PARÁMETROS ANALIZADOS.....	35
3.9.1 Sólidos sedimentables	35
3.9.2 Sólidos suspendidos	36
3.9.3 Turbidez.....	37
3.9.4 Demanda química de oxígeno	39

4. RESULTADOS.....	40
4.1 resultados de la toma de muestras	40
4.2 mapas georreferenciados de los puntos de muestreo.....	40
4.3 conteo microbiano de microorganismos halófilos aislados de perfiles costeros de ecuador	47
4.4 determinación de la actividad proteolítica.....	48
4.5 biorremediación de agua residual sintética	49
5. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	52
5.1 analisis del crecimiento microbiano.....	52
5.2 análisis estadístico del crecimiento microbiano aplicando plackett – burman.....	52
5.2.1 Análisis de los efectos principales	52
5.2.2 Análisis de residualidad del diseño Plackett - Burman.....	55
5.2.3 Análisis de la Varianza (ANOVA).....	59
5.3 análisis de los efectos de los factores en el crecimientomicrobiano	60
5.5 análisis de la actividad proteolítica	66
5.6 análisis de resultados de los parámetros medidos en el agua residual y tratada	66
5.6.1 Sólidos Sedimentables	66
5.6.2 Sólidos Suspendidos	68
5.6.3 Turbidez.....	69
5.6.4 Demanda química de oxígeno	69
5.7 análisis de la propuesta económica	71

5.7.1 Costos de inversión	71
5.7.2 Costo de operación y mantenimiento.....	72
5.7.3 Beneficios para el sistema actual.....	72

CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES Y

RECOMENDACIONES	74
-----------------------	----

6.1 Conclusiones	74
------------------------	----

6.2 Recomendaciones.....	75
--------------------------	----

REFERENCIAS	77
-------------------	----

ANEXOS	81
--------------	----

INTRODUCCIÓN

Un pilar muy importante de la economía ecuatoriana es la de la industria pesquera, que abarca las actividades de pesca, cultivo y procesamiento de pescado y mariscos.

La exportación de productos como camarón, diferentes tipos de pescado y enlatados de pescado representa un gran porcentaje de los productos no petroleros que el Ecuador ofrece a mercados internacionales.

Uno de los principales problemas ambientales causados por la operación de la industria, se halla en las fábricas de procesamiento, debido a la gran cantidad de agua residual que de ellas se origina. Estas aguas residuales se caracterizan por contener altas cantidades de sales inorgánicas, que se combinan con altas cargas orgánicas, por lo que es muy difícil de remediar mediante tratamientos comunes.

En el siguiente estudio se determina la mejor fórmula para obtener un crecimiento óptimo de bacterias tolerantes a niveles altos de salinidad, mediante un diseño en el que se crearon 12 fórmulas que contenían los mismos reactivos, pero en diferentes concentraciones.

Una vez seleccionado el medio óptimo, el cultivo bacteriano fue utilizado para simular un tratamiento biológico de aguas residuales con elevadas cantidades de sal junto con carga orgánica, similar al agua residual de las fábricas procesadoras de pescado.

Alcance

Este proyecto tiene como alcance determinar un medio de cultivo adecuado para generar mejores condiciones de crecimiento y proliferación de estas bacterias para su posterior aislamiento.

Una vez aisladas estas bacterias serán utilizadas para degradar contaminantes en aguas con alta salinidad.

Justificación

En muchas industrias el mayor problema es el tratamiento de aguas, en las industrias de conservas y atuneras las aguas residuales contienen una alta cantidad de sal, y su descontaminación en sus aguas residuales esto se complica debido a que la mayoría de bacterias degradadoras no resiste estas condiciones.

Con este proyecto se plantea una solución para reducir la contaminación de los cuerpos de agua receptores cercanos a estas industrias y que hasta el momento no son bien tratadas, mediante la selección de bacterias que resistan estas condiciones y realicen el tratamiento.

OBJETIVOS

Objetivo general

- Diseñar un proceso para la biorremediación de aguas residuales con alta salinidad.

Objetivos específicos

- Diseñar un plan de muestreo de matrices ambientales en perfiles costeros de Ecuador para el aislamiento de bacterias halófilas
- Seleccionar el procedimiento más adecuado para el aislamiento.
- Determinar el medio de cultivo óptimo para el crecimiento de bacterias halófilas aisladas de perfiles costeros de Ecuador
- Demostrar la actividad degradadora de las cepas bacterianas aisladas.
- Determinar la eficiencia de un sistema de Biorremediación de aguas residuales con alta salinidad mediante bacterias halófilas aisladas.

1. ASPECTOS GENERALES

1.1 ACTUALIDAD DE LA GENERACIÓN DE DESECHOS EN LA INDUSTRIA PESQUERA

En ciudades costeras del Ecuador como Manta y Esmeraldas como las principales ciudades dedicadas a esta actividad, se ubican industrias procesadoras de pescado y productos de mar que son de gran importancia para la economía local y nacional por la gran cantidad de puestos de trabajo que generan (16.860 directos y 80.000 indirectos)(Diario, Atún: Exportaciones y capturas en alza, 2013), porque la exportación de estos productos ha crecido de forma significativa en los últimos años, generando aproximadamente 2.400 millones de dólares, entre productos enlatados de pescado y camarón(Villanueva, 2013).

En estas ciudades se descargan aguas residuales con niveles altos de salinidad provenientes de los procesos industriales del procesamiento de productos de mar e industrias de conservas, y de las descargas de aguas negras urbanas, que tienen una elevada cantidad de sales. Aunque estos procesos cuentan con plantas para el tratamiento de aguas residuales, estos no son eficientes (El Diario, 2011) ya que después de la descontaminación se mantiene la cantidad de sal.

En Manta existen lagunas de oxidación para tratar los desechos líquidos formados por un 80% de aguas residuales industriales y 20% de aguas residuales urbanas. En los resultados de los análisis físico – químicos, se demostró que estos exceden los límites permisibles por la legislación ecuatoriana. Se estableció que el mayor problema para que no sea posible la degradación de los contaminantes son las altas concentraciones de sal presentes en estos procesos por los efectos inhibitorios ocasionados por las sales sobre los organismos degradadores.

En esta misma ciudad se encuentran 11 de las 18 empresas procesadoras de atún que existen en el país (El Diario, 2013). Aunque en la mayoría de estas empresas hay plantas de tratamiento de aguas, sus sistemas de tratamiento no son eficientes y emiten malos olores (Diario, 2011), ya que los microorganismos degradadores toman mucho tiempo en empezar a trabajar en estos sistemas debido a las condiciones salinas del agua.

1.2 PROPUESTA DE TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES DE INDUSTRIALES PESQUERAS

Sabiendo la importancia económica y social de esta industria, y la problemática que actualmente existe en relación a las descargas de aguas residuales, en las que los microorganismos no pueden sobrevivir debido a la gran cantidad de sales que en ellas existen, en este estudio se plantea la hipótesis de aislar bacterias halófilas que son capaces de sobrevivir en condiciones de alta salinidad, para aplicarlas en el tratamiento de aguas residuales con alta salinidad. De esta manera, se propone lograr una mejor degradación de contaminantes que actualmente se consigue de forma incompleta y causa problemas en los pobladores cercanos (El Diario, 2011).

2. MARCO TEÓRICO

2.1 PROCESOS DE BIORREMEDIACIÓN DE AGUAS RESIDUALES SALINAS

La biorremediación es la rama de la biotecnología ambiental que utiliza organismos vivos como plantas, hongos y microorganismos (Rittmann y McCarty, 2001 p 7) para mejorar la calidad de ambientes contaminados, mediante procesos como la degradación de los cuales son capaces los microorganismos (Tejedor, 2011).

Los organismos utilizados para remediación se alimentan de los contaminantes y los degradan mediante reacciones de oxidación y reducción.

Se pueden utilizar para remediar efluentes de aguas residuales y contaminantes vertidos en el suelo (Vidali, 2001), poseen varias ventajas sobre otros métodos de remediación, estos son: bajo costo, remediación in situ, mantenimiento casi nulo y corto periodo de tiempo (Tejedor, 2011).

A continuación, se analiza los efectos de la salinidad en los tratamientos biológicos de aguas residuales. Los tratamientos biológicos convencionales utilizados para el tratamiento de aguas residuales son conocidos por la baja remoción de DQO en aguas residuales salinas por los efectos adversos de la sal en la flora microbiana (Kapdan y Erten, 2006, p 449) ya que las células reducen su actividad por la plasmólisis y deshidratación causadas por el cambio en la osmolaridad del medio que se produce por la presencia de sal (Gonzalez y Peña, 2002, p 148).

Otros efectos adversos que ocurren por la presencia de sal en el tratamiento de estas aguas son baja reducción de materia orgánica e incremento de sólidos suspendidos (Moon, Heo, y Choi, 1997, p 136) lo que genera poca sedimentación y turbidez del agua. Los organismos protozoarios también ayudan a reducir la turbidez en los tratamientos biológicos, pero la presencia de

sal en el agua reduce su actividad ya que no pueden sobrevivir (Lafabvre y Moletta, 2006, p 3674).

2.2 USO DE BACTERIAS PARA LA BIORREMEDIACIÓN

Las bacterias son microorganismos que se encuentran en todos los ambientes, y sus especies son similares en cualquier parte del mundo (Rittmann y McCarty, 2001, p 7), poseen la capacidad de transformar una gran variedad de contaminantes inorgánicos y orgánicos en minerales inocuos para el medio ambiente.

Las bacterias como los demás microorganismos utilizados para biorremediación necesitan que el ambiente en el que se desarrollan sea el adecuado para su crecimiento y proliferación, y de este modo puedan llevar a cabo sus reacciones de óxido reducción. Para esto se debe tener en cuenta que el medio de desarrollo contenga una fuente de energía, nutrientes y condiciones físicas y químicas favorables para la vida de los organismos.

2.2.1 Uso de bacterias halófilas para la biorremediación

Existen condiciones extremas (salinidad, temperatura, pH) en ciertos ambientes y medios que se intenta remediar mediante tratamientos biológicos en los cuales los microorganismos utilizados comúnmente no resisten estas circunstancias y su rendimiento de reducción de contaminantes es muy bajo o nulo.

Por esto se han realizado estudios para aislar y usar microorganismos especializados, como las bacterias halófilas en el caso de la salinidad, para obtener mejores resultados en la remediación de estos ambientes.

Las bacterias y otros microorganismos halófilos se caracterizan por vivir en ambientes hipersalinos acuáticos (mayores a 3,5% de sales totales), y es por esta capacidad que estos microorganismos han sido objeto de estudio para la remediación de aguas y suelos con concentraciones altas de sal.

Los estudios realizados utilizan a estos microorganismos en diferentes sistemas de tratamiento, estos estudios varían las concentraciones de sales utilizadas. Los resultados de remoción de contaminantes en los diferentes estudios muestran mayor eficiencia dependiendo del método utilizado y la concentración de sales.

Los lodos activados no generan una buena remediación en aguas con alta salinidad por lo que el estudio realizado por Kargi (Enhanced biological treatment of saline wastewater by using halophilic bacteria, 2002, p 1569-1571) utiliza lodo activado obtenido en una fábrica de levadura y lo suplementa con bacterias de la cepa *Halobacter halobium*, la concentración de sal en el estudio varía del 1% al 5% y los resultados obtenidos llegan al 85% de reducción de DQO. Otro tratamiento utilizado para este tipo de bacterias es el proceso de biodiscos, para el cual se construyó una planta piloto de 4 etapas, con 9 discos de metacrilato cada una, los discos soportaban una película de organismos halófilos, este sistema se realizó con agua residual sintética en 2 concentraciones (15.000 y 1.500 ppm de sal), los resultados de reducción de DQO en ambos casos fue del 90% (Castillo, Bezanilla, Amieva, Jácome, y Tejedor, 1995, p 27,28). Kargi y Dinçer (Biological treatment of saline wastewater by fed-batch operation, 2000) usaron un tratamiento por lotes (*fed-batch*), el que consta de un tanque de aireación en el que se vierten los microorganismos activos, y se lo llena con el agua residual hasta que el tanque se llena por completo antes de pasar al siguiente tanque, la salinidad utilizada fue variando desde 0-5% con resultados de eliminación de DQO que decrecieron de 85% a 59% mientras incrementaba la concentración de sales.

2.3 AGUAS RESIDUALES CON ALTA SALINIDAD

Las aguas residuales con altos contenidos de salinidad (>2%), proceden de procesos industriales como pesqueros (Dan, 2001, p 1), alimentos de conserva, curtiembre, industria química, procesos petroquímicos (Lafabvre y Moletta, 2006, p 3671), producción de fertilizantes, pesticidas y en recuperación de aceites (Castillo, Bezanilla, Amieva, Jácome, y Tejedor, 1995, p 25).

También pueden existir descargas de aguas salinas en ciudades costeras e isleñas, donde debido a la escasez de agua dulce, se utiliza agua salina para el uso de inodoros, o porque existen entradas de agua de mar durante mareas altas en la red de alcantarillado (Castillo, Bezanilla, Amieva, Jácome, y Tejedor, 1995, p 25).

La presencia de estas sales afecta el diseño de las plantas de tratamiento debido a que inhiben y reducen la presencia de materia orgánica y causan problemas de sedimentación en las fases del tratamiento (Castillo, Bezanilla, Amieva, Jácome, y Tejedor, 1995, p 25). Además, de limitar la vida los microorganismos que cumplen con las funciones de degradación de los contaminantes (Lafabvre y Moletta, 2006, p 3674).

Por lo tanto, de acuerdo a las referencias bibliográficas, dependiendo de la naturaleza del proceso algunas aguas residuales tienen variaciones de salinidad y carga orgánica, siendo esta combinación la más difícil de tratar por métodos convencionales.

2.3.1 Industria alimenticia

Es la industria que más descargas de agua salina produce, dentro de estas se destacan la industria pesquera, de procesamiento, enlatados, vegetales y queseras cuyas aguas se caracterizan un gran contenido de carga orgánica combinado con salinidad (Dan, 2001, p 1), debido a la naturaleza de sus

procesos. Dentro del sector de procesamiento de alimentos también existen las industrias de conservas, que usan salmueras para que los alimentos se conserven.

Otro aspecto que causa preocupación dentro de este sector, es la gran cantidad de agua dulce utilizada en los procesos de limpieza, lavado de la materia prima, congelamiento y descongelamiento (Dan, 2001, p 1). La mayor parte de esta agua se mezcla con la sal y contaminantes orgánicos, creando descargas mayores de aguas residuales en estas industrias.

2.3.2 Industria petroquímica

Como subproducto en la extracción de petróleo y gas, una gran cantidad de agua es traída a la superficie con los hidrocarburos (Medina, 2007, p 1). Se trata de una capa de agua que se encuentra en el subsuelo, debajo de los hidrocarburos, y sale a la superficie durante la producción de gas y petróleo (Guerra, Dahm, y Dundorf, 2011, p 3).

Por cada barril de petróleo producido, se estima que se extraen 10 barriles de agua de producción (Sullivan, Bowman, Katz, y Kerry, 2004, p 216), la misma que contiene una diversidad de sales como sulfatos, calcio, bicarbonatos. En el proceso de perforación, además se inyecta agua para ayudar a la salida del petróleo del pozo hacia la superficie, lo que aumenta la cantidad de agua residual en este proceso (Guerra, Dahm, y Dundorf, 2011, p 3).

2.3.3 Industria de curtiembre

Esta industria que transforma las pieles animales en cuero, utiliza diversas sales en los procesos de pelambre, desencarnado y curtido. Estas sales utilizadas son: carbonatos, sulfatos, sulfuros, sales de cromo (Umaña, 2004, p7), también existen productos químicos en los procesos, que combinada con los residuos orgánicos (sangre, piel, carne, pelos) genera un agua residual muy

difícil de tratar por su alta carga orgánica y sus sales disueltas (Durai y Rajasimman, 2011, p 1).

2.4 TECNOLOGÍAS DE TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES CON ALTA SALINIDAD

Debido a los problemas que ocurren en los tratamientos biológicos por la salinidad, se han utilizado en estas aguas residuales tratamientos físico – químicos para reducir la carga orgánica y disminuir la salinidad. A pesar de su buen funcionamiento, estos tratamientos tienen la desventaja de ser muy costosos en su instalación, operación y mantenimiento.

2.4.1 Técnicas térmicas

Se trata de técnicas para la evaporación del agua residual mediante el uso de la energía del sol, por el uso de calderas secuenciales o evaporación al vacío (Casas, Elías, Casas, y López, 2008, p 57). El objetivo de este tratamiento es el de reducir el caudal del agua residual y concentrar las sales para poder separarlas del agua. La ventaja de esta técnica es su bajo costo ya que en el uso de la energía solar, el único costo es su instalación, mientras que en los calderos se aprovecha el calor obtenido en el anterior, y solo se usa la energía producida por combustibles fósiles en el primer caldero (Lafabvre y Moletta, 2006, p 3673).

2.4.2 Coagulación - floculación

Es un tratamiento utilizado para reducir la turbidez y carga orgánica de las aguas residuales mediante la adición de sustancias químicas. El primer paso de este tratamiento es la aplicación de coagulantes, estos desestabilizan las cargas de las partículas. Las partículas con sus cargas neutralizadas se aglomeran (Armenante, 1999). La adición de floculantes sirve para que los agregados formados por la coagulación se unan unos a otros y que precipiten (Bratby, 2006, p 240).

2.4.3 Intercambio iónico

Ocurre cuando el agua que contiene iones en disolución entra en contacto con un intercambiador iónico, el cual tiene cationes o aniones intercambiables en su superficie. Al entrar en contacto, el intercambiador con el líquido, se produce un intercambio de iones del mismo signo (Rodríguez, 1995, p 20). El material soluble (sales) que se encontraba en el agua queda atrapado en el intercambiador.

2.4.4 Técnicas de membrana

Consiste en la transferencia de moléculas por concentración, diferencial de presión o campo eléctrico (Lafabvre y Moletta, 2006, p 3673). Para las aguas residuales salinas se pueden utilizar técnicas como la ultrafiltración, que reduce los sólidos suspendidos y la DQO (Afonso y Bórquez, 2002, p 29), pero no reducen la salinidad. Técnicas más avanzadas como la ósmosis inversa, reducen la materia orgánica y la concentración de sal.

2.4.5 Bacterias aerobias

Debido al bajo rendimiento por la inhibición y muerte de los microorganismos al tratar aguas residuales con altas concentraciones de sal, se han realizado diversos estudios en los que se han aislado bacterias halófilas y halotolerantes para que remedien estas aguas.

Existen diversos estudios utilizando bacterias aerobias, los cuales han sido desarrollados utilizando diversas técnicas, como son lodos activados, biodiscos y bio-reactores, todos estos tienen resultados de remoción variables dependiendo de la salinidad con que se trabajó.

2.5 AISLAMIENTO DE BACTERIAS HALÓFILAS

El aislamiento e identificación de bacterias sirve para determinar las características y propiedades de los diferentes géneros y poder determinar sus posibles usos en la industria, gracias a sus metabolitos y enzimas (Narváez, 2007, p 1).

Las bacterias halotolerantes y halófilas, son organismos vivos capaces de habitar ambientes con concentraciones de salinidad del 1 al 20%, aunque existen ciertos organismos capaces de resistir concentraciones mayores al 30% de sal (Ates, Oner, Arikan, Denizci, y Kazan, 2007, p 369).

Los microorganismos extremófilos, de los que forman parte las bacterias halófilas, tienen características únicas para poder soportar los ambientes en los que habitan, por lo que es cada vez más importante su aislamiento para el uso de sus enzimas, proteínas y metabolitos, las cuales poseen propiedades que difieren de las de otros microorganismos.

2.5.1 Usos de las bacterias halófilas

Tanto las bacterias halófilas aisladas como sus enzimas son usadas para diferentes sectores industriales como la producción de enzimas, producción de polímeros, biorremediación, industria alimenticia, entre otras.

2.5.1.1 Producción de enzimas

De estas bacterias se han detectado y obtenido varias enzimas, como hidrolasas (amilasas, lipasas, proteasas, nucleasas y pululanases) que son de alto interés industrial por los diversos usos que tienen en la industria alimenticia y farmacéutica (Ramirez, Sandoval, y Serrano, 2004, p 59).

2.5.1.2 Biopolímeros

Los polímeros obtenidos de bacterias halófilas han sido utilizados en la industria petrolera con muy buenos resultados gracias a sus propiedades surfactantes y emulsionantes, los que aumentan la eficacia de los procesos de extracción del crudo, gracias al aumento en la viscosidad del agua por estos polímeros (Narváez, 2007, p 12).

Los polímeros obtenidos del genero *H. eurihalina* pueden ser utilizados en la industria farmacéutica y en remediación (Ramirez, Sandoval, y Serrano, 2004).

2.5.1.3 Biorremediación

Estas cepas bacterianas han demostrado ser una alternativa para la degradación de residuos tóxicos especialmente en ambientes hipersalinos, en los que los tratamientos con cepas comunes no dan resultados (Ramirez, Sandoval, y Serrano, 2004).

Otras cepas halófilas también demostraron gran eficacia al tratar metales pesados como: cadmio, cobre, cinc, cromo y mercurio (Ramirez, Sandoval, y Serrano, 2004).

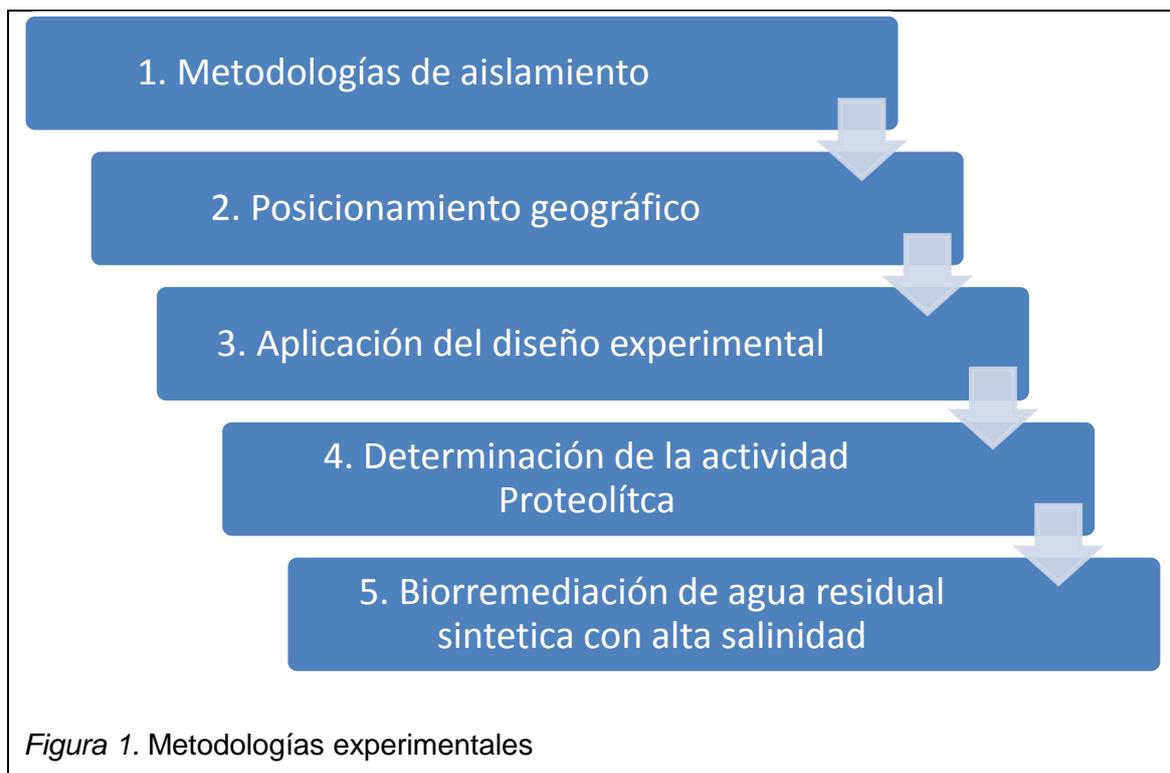
2.5.1.4 Otros Usos

Las bacterias halófilas pueden ser utilizadas también en procesos de fermentación de alimentos, para producir solutos resistentes a la sal y en la industria farmacéutica. Actualmente se realizan estudios para crear plantas resistentes a las sales para que estas puedan obtener minerales de suelos hipersalinos sin sufrir daños.

3. METODOLOGÍA

En esta sección se muestran todas las metodologías utilizadas a lo largo de este estudio para alcanzar tanto el objetivo general como los específicos.

En la figura 1 se muestran los pasos realizados para alcanzar dichos objetivos. En primer lugar están las metodologías de aislamiento, en las que se encuentran la toma de muestras de agua en perfiles costeros del Ecuador, el aislamiento de bacterias halófilas en medio sólido y el crecimiento de bacterias en medio líquido.



En segundo lugar se encuentran la toma de puntos GPS en los lugares de toma de muestras de aguas naturales salinas y el procesamiento de estos dentro del software ARCGIS para obtener los mapas georreferenciados de los lugares en donde fueron tomadas las muestras.

En el punto tres se explica la aplicación del diseño experimental Plackett-Burman en este caso para obtener la fórmula óptima de medio de crecimiento para bacterias halófilas variando las concentraciones de los compuestos utilizados.

El cuarto punto trata sobre el experimento realizado para determinar si las bacterias aisladas de las muestras mostraban degradación de proteínas.

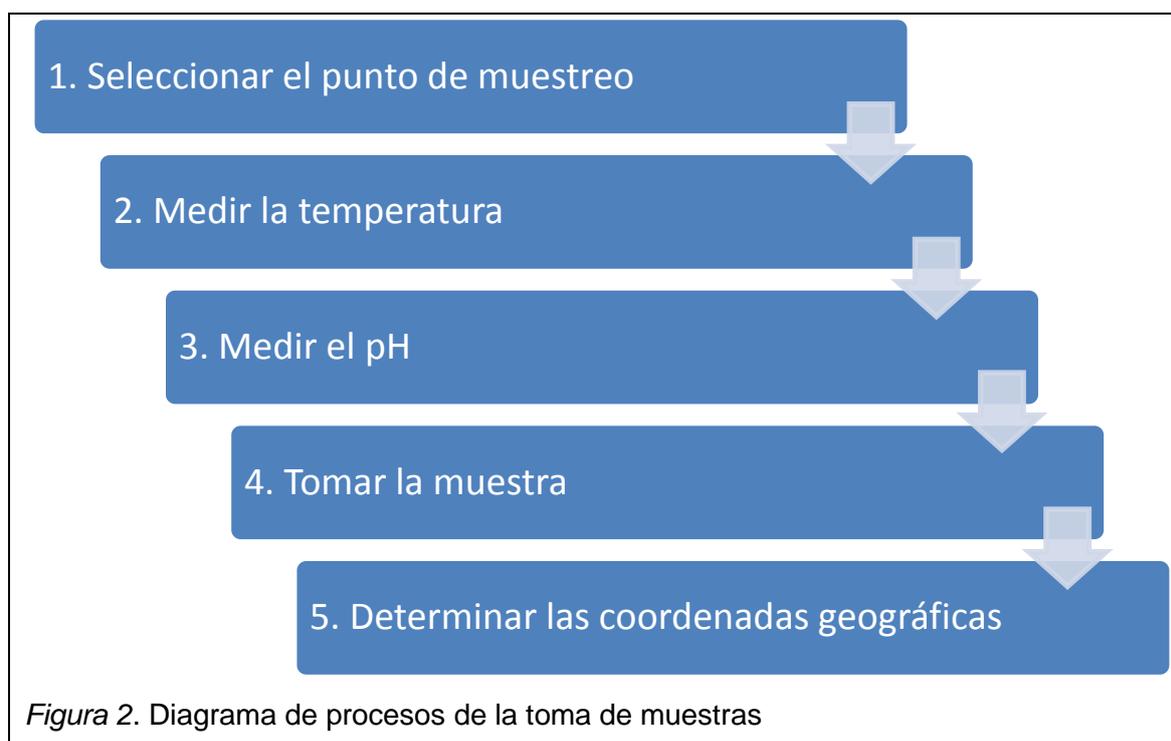
En el último punto se detalla en que se utilizan las bacterias durante la remediación de aguas residuales con alta salinidad, cuáles fueron las características del agua, qué condiciones fueron tomadas en cuenta para el tratamiento y por último los parámetros analizados para determinar la eficiencia del tratamiento.

En el presente trabajo no se contempla la caracterización de los microorganismos aislados.

3.1 TOMA DE MUESTRAS DE AGUAS DE MAR DEL PERFIL COSTERO ECUATORIANO

Se tomaron muestras de agua salina natural, marina y de esteros, en diferentes puntos de la costa ecuatoriana para obtener las diferentes cepas bacterianas. Estas cepas bacterianas del agua se adaptaron a los medios de cultivo con alta salinidad para posteriormente ser utilizadas en biorremediación de aguas residuales. Para seleccionar los lugares en los que se tomarían las muestras, se buscó que sus características ambientales sean distintas.

En la Figura 2 se observa el diagrama de procesos para la toma de muestras de agua natural salina para obtener las cepas bacterianas.



En los diferentes puntos de muestreo se procedió a medir la temperatura y el pH del agua, para luego recoger la muestra en una botella oscura. Esto se realizó con la botella completamente sumergida, y cuando esta se llenó, fue tapada debajo del agua. El siguiente paso fue tomar el punto de georreferenciación con el GPS (Sistema de Posicionamiento Global). Por último se almacenaron las muestras en un cooler, sin hielo, para evitar el cambio brusco de temperatura del agua de la muestra, hasta poder refrigerarlas a una temperatura aproximada de 5 °C.

Los puntos de muestreo fueron tomados en la provincia de Manabí, en las localidades Leónidas Plaza, San Vicente, Canoa y Pedernales. Las muestras fueron tomadas en fuentes naturales, con diferentes características para observar en cuál de estos ambientes se encuentra una mayor cantidad de colonias bacterianas.

En la Tabla 1 se especifican las características del agua y el lugar de cada uno de los puntos de muestreo.

Tabla 1. Puntos de muestreo

Lugar de muestreo	Características de la muestra	Observaciones
Leónidas Plaza (M1)	El agua presentaba una coloración verdosa.	En el momento de la toma de muestra en esta ubicación, pescadores artesanales se encontraban faenando su pesca y desechando sangre y otros residuos orgánicos directamente al mar.
San Vicente (M2)	El agua en donde se tomó esta muestra presentaba una tonalidad oscura debido a la gran cantidad de arena.	Esta muestra fue tomada en el estuario del río Chone, en el sitio no se observó una fuente de contaminación.
Canoa (M3)	Se trataba de agua dulce muy clara.	La muestra fue tomada en un pequeño río de agua dulce, cerca de su desembocadura al mar.
Pedernales (M4)	Esta muestra tenía una tonalidad oscura.	La muestra fue tomada en una entrada de mar, en las orillas existen asentamientos humanos, por lo que se puede suponer que los desechos son vertidos directamente en esta zona.

En la Figura 3 se observa el punto de muestreo 4 tomado en la ciudad de Pedernales, en esta se pueden ver los asentamientos cercanos y el estado del agua.



Figura 3. Punto de muestreo ubicado en la ciudad de Pedernales (M4).

3.2 GEORREFERENCIACIÓN DE PUNTOS DE MUESTREO MEDIANTE GPS

En cada punto de muestreo se determinó su ubicación geográfica, esto permitió tener una localización exacta de los lugares en donde se tomaron las muestras con la finalidad de crear un mapa georreferenciado de los puntos, con la información característica de los mismos. Estos mapas se encuentran en el Capítulo 4: Resultados.

En el punto de muestreo, se procedió a encender el GPS y se seleccionó la opción de toma de puntos. Para garantizar la exactitud del punto, debemos esperar a que el GPS se conecte con al menos 6 satélites.



Figura 4. Toma de puntos GPS en la parroquia Canoa

Una vez que se tomaron todos los puntos, estos fueron ingresados en el programa ARCGis versión 9, junto con las cartas topográficas correspondientes a estos sectores de la costa ecuatoriana, para crear un mapa georreferenciado de los puntos de muestreo.

Para la creación de los mapas, se utilizó cartografía de acceso libre disponible en el portal web del Instituto Geográfico Militar. Los archivos descargados para la elaboración de los mapas de muestreo tienen un formato shapefile y se encuentran en una escala de 1:50.000.

Los archivos utilizados para la creación del mapa georreferenciado fueron:

- Pedernales
- 10 de agosto
- Jama
- Convento
- Canoa
- San Isidro
- Ricaurte
- Bahía de Caráquez

3.3 AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS HALÓFILOS MEDIANTE ENRIQUECIMIENTO

Para el aislamiento de microorganismos se preparó un medio de cultivo tanto en agar nutritivo, para su conteo y aislamiento (sólido) como en medio EC, para su crecimiento (líquido).

En el caso de los dos tipos de medio se seleccionaron nutrientes y sales para simular condiciones parecidas al de agua salada, a la que este tipo de microorganismo está adaptado para crecer y desarrollar sus funciones vitales.

3.3.1 Aislamiento de bacterias en medio sólido mediante estriado

Para el aislamiento de bacterias se utilizaron dos metodologías. Primero se realizó una siembra directa tomando 150 μ L de agua de mar en los cultivos, para obtener un gran crecimiento de cepas en el medio de cultivo.

La segunda parte del aislamiento se realizó por la técnica de estriado y sirvió para obtener un cultivo puro. Para éste se tomó una cepa de la siembra directa con un asa esterilizada y se la colocó en un medio nuevo, para así tener cepas bacterianas puras.

El aislamiento de bacterias en medio sólido sirve para determinar por conteo de cepas bacterianas los medios más aptos para el crecimiento de bacterias halófilas.

En la Figura 5 se describe un diagrama de procesos para el aislamiento y crecimiento bacteriano tanto para los medios sólidos como líquidos.

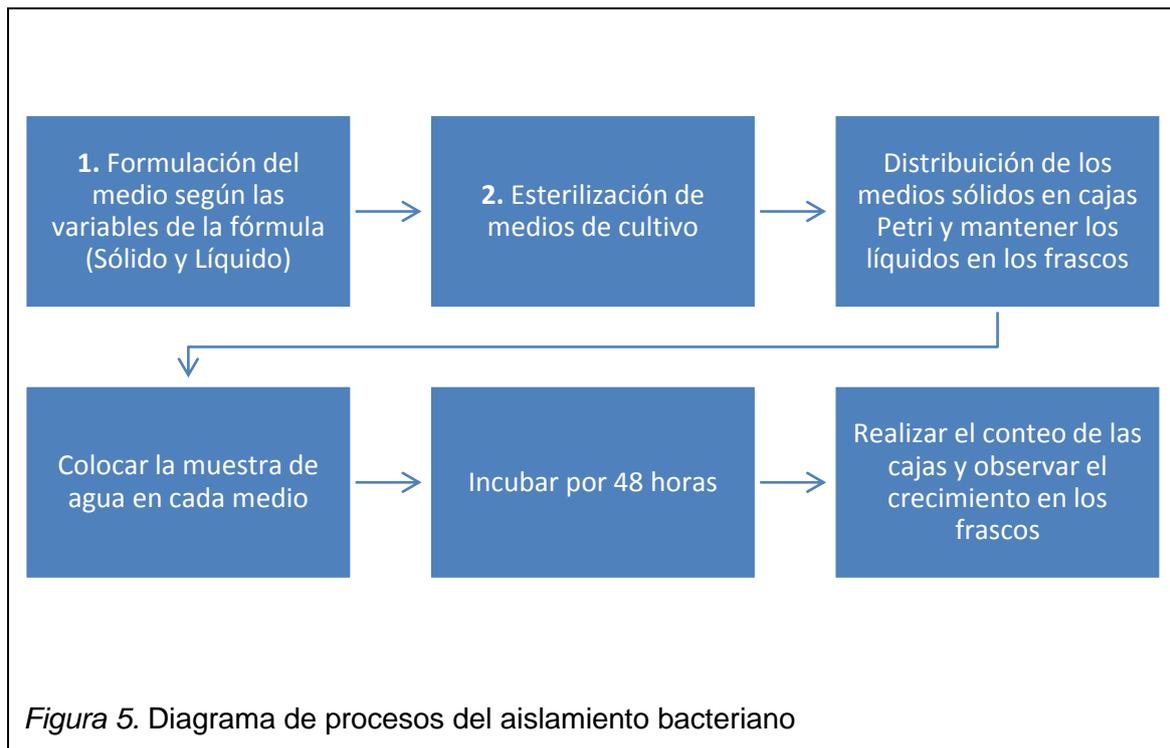


Figura 5. Diagrama de procesos del aislamiento bacteriano

En la Tabla 2 se muestran los compuestos utilizados como nutrientes y sales para los medios de cultivo tanto sólido como líquido.

Tabla 2. Contenido del medio

Compuesto
Sulfato de magnesio heptahidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)
Extracto de levadura
Peptona
Cloruro de Calcio ($CaCl_2$)
Cloruro de Amonio (NH_4Cl)
Sal ($NaCl$)

3.3.2 Aislamiento de halófilos aplicando un diseño factorial fraccionado Plackett-Burman

Para el diseño experimental se utilizó los compuestos descritos en la Tabla 2 como variables independientes (factores). Además, una variable categórica que se incluyó fue la procedencia de la muestra: muestras de agua de mar tomadas de los perfiles costeros; siendo F1 la muestra tomada en la localidad de Leónidas Plaza y F2 la muestra tomada en San Vicente. Con estas variables, se realizó un diseño experimental “Plackett-Burman” (Plackett y Burman, 1946, pp 305-325), para definir en qué condiciones existe mayor crecimiento bacteriano. Este diseño sirve como un método de barrido (Screening design), y sirve para la búsqueda o selección de los factores más influyentes en la respuesta de un experimento (García, 2007, p 79).

En la Tabla 3 se encuentra la cantidad que fue utilizada de cada compuesto en el nivel alto y bajo en el diseño experimental.

Tabla 3. Cantidad utilizada por nivel de los compuestos

Nivel	MgSO ₄ 7H ₂ O	Extracto de levadura	Peptona	CaCl ₂	NH ₄ Cl	NaCl	Fuente
	A	B	C	D	E	F	G
Alto (+)	0.9g	0.6g	0.9g	0.02g	0.9g	9g	Leónidas Plaza
Bajo (-)	0.1g	0.2g	0.1g	0.01g	0.1g	3.75g	San Vicente

En la Tabla 4 se presenta el modelo Plackett-Burman usado para determinar la formulación de las fórmulas de los medios de cultivo, dado por el nivel de las variables.

Tabla 4. Modelo Plackett-Burman utilizando las variables para crear los medios de cultivo

	MgSO ₄ 7H ₂ O	Extracto de levadura	Peptona	CaCl ₂	NH ₄ Cl	NaCl	Fuente
1	+	-	+	-	-	-	+
2	+	+	-	+	-	-	-
3	-	+	+	-	+	-	-
4	+	-	+	+	-	+	-
5	+	+	-	+	+	-	+
6	+	+	+	-	+	+	-
7	-	+	+	+	-	+	+
8	-	-	+	+	+	-	+
9	-	-	-	+	+	+	-
10	+	-	-	-	+	+	+
11	-	+	-	-	-	+	+
12	-	-	-	-	-	-	-

El modelo Plackett-Burman definió 12 medios de cultivo (fórmulas) con los componentes en 2 niveles diferentes (mayor y menor). Una vez definidos los medios con mayor crecimiento, se prepararon solo estas formulaciones para medio líquido.

Para preparar los medios de cultivo se colocó 150 ml de agua destilada en un matraz de Erlenmeyer, se pesó 3.45g de agar nutritivo (23 g/L) y se agregó al agua destilada, se pesó los compuestos restantes según la fórmula del modelo Plackett-Burman, el Erlenmeyer se colocó en una plancha de calentamiento con agitación a 200°C, hasta que los compuestos se disuelvan completamente en el agua.

Una vez que se prepararon los medios, estos se esterilizaron en una autoclave a 121°C y 103 kPa de presión. Una vez esterilizados, los medios son llevados a una cámara de flujo laminar, previamente esterilizada con luz UV.

Cada medio es distribuido en 3 cajas Petri, para tener suficientes repeticiones de cada una de las fórmulas del diseño experimental, cuando se colocó el medio en las cajas Petri, éste estaba caliente y en estado líquido, por lo que se

esperó a que se solidifique y enfríe para realizar la siembra. Una vez que el medio se encuentra listo, se colocó 100 μL (0.1 mL) de la muestra de agua.

Las cajas Petri que fueron sembradas se colocaron en una incubadora a 37°C, se controló el crecimiento bacteriano el primer día.



Figura 6. Siembra en medio sólido

Una vez transcurridas las 48 horas, se retiraron las cajas de la incubadora para realizar el conteo de cepas microbianas, éste procedimiento se realiza siempre que las cepas se encuentren de manera independiente unas de otras y no formando una sola masa. Si las cepas están unidas unas de otras se procede a realizar una dilución seriada de la muestra de agua y se la coloca en medio fresco hasta encontrar la disolución en la que se pueden contar a los microorganismos.

Cuando se encontró una disolución en la que se diferencian las estructuras bacterianas, se cuenta las unidades formadoras de colonia (UFC). Una vez

contadas las colonias que existen, se determinó el número real de colonias que existen por mililitro, lo cual se realiza con la siguiente fórmula.

$$\frac{UFC}{mL} = \# \text{ de colonias} \times \frac{1}{\text{dilución}} \quad (\text{Ecuación 1) Número real de colonias}$$

3.3.3 Crecimiento de bacterias en medio líquido

Para el medio líquido se vertieron 150 ml de agua en los matraces de Erlenmeyer, se colocaron 7 gramos de medio EC, y las correspondientes cantidades de los compuestos determinados por el diseño Plackett-Burman. Se calentaron y agitaron en la placa calefactora a 200°C hasta la disolución completa de las sales y compuestos químicos en el agua destilada.

Posteriormente, fueron llevados a la autoclave para esterilizarlas, en las mismas condiciones que los medios sólidos, cuando salieron de la esterilización se los llevó a la cámara de flujo estéril y se esperó a que los medios líquidos estén a temperatura ambiente para colocar la muestra de agua, ya que las bacterias se verían afectadas en altas temperaturas.

El siguiente paso fue trasladar a las colonias de bacterias del medio sólido al líquido, para lo cual tomamos al inóculo del medio sólido, con ayuda de un asa de platino esterilizada con fuego, con el asa se tomó la colonia, y se la colocó en el medio líquido.



Figura 7. Medio de cultivo líquido sin sembrar (izq.) y sembrado (der.)

3.4 CRECIMIENTO BACTERIANO POR TIPO DE MUESTRA

Dentro de las actividades realizadas para determinar el crecimiento, se analizaron todas las muestras con el objetivo de saber en qué medios existe mayor cantidad de microorganismos y elegir cuales se utilizarían para la biorremediación, o si todos son aptos para ésta.

3.5 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA MEDIANTE DIGESTIÓN CON CASEÍNA

Para la determinación de la actividad proteolítica se sembró a las bacterias aisladas en un medio de cultivo compuesto de bacto agar, leche descremada, extracto de levadura al 0.5% y 1% peptona, este medio es suplementado con una solución salina denominada SW5 (Narváez, 2007, p 29). La solución contiene por litro: 234g de cloruro de sodio, 39g cloruro de magnesio

hexahidratado, 61g de sulfato de magnesio, 6g de cloruro de potasio, 0.7g bromuro de sodio, 0.2g de carbonato ácido de calcio y 1g cloruro de calcio, para mantener condiciones similares a la de medios marinos (Narváez, 2007, p 26). Esta solución se encuentra a una concentración de 30% de salinidad, y para su uso en el medio se la diluye a una concentración de 5%.

Para la preparación del medio se debe esterilizar la leche por separado para evitar que el medio se dañe al calentar a las altas temperaturas de la autoclave. El medio es colocado en cajas Petri, y una vez que las bacterias son sembradas son colocadas en una incubadora a una temperatura de 37°C por 72 horas.

En la Figura 8 se muestra cómo se realizó la estimación de la actividad proteolítica mediante halos de degradación.



Figura 8. Cepas bacterianas con halos de degradación

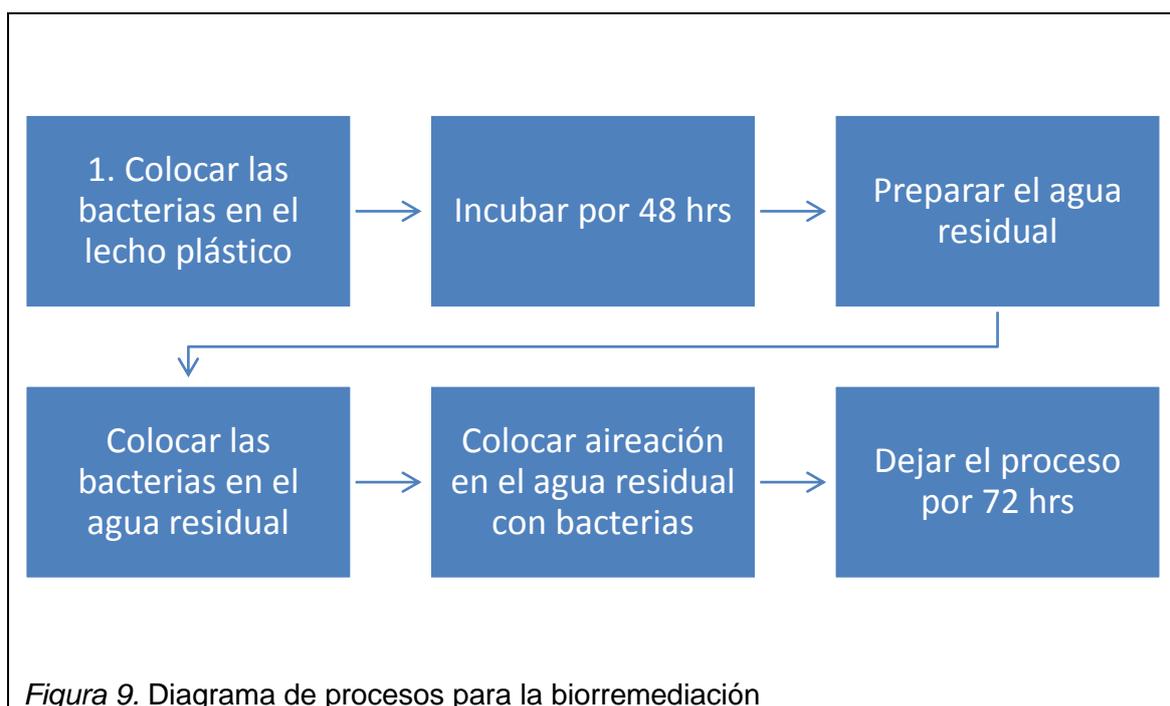
La actividad proteolítica se determina por la presencia de halos alrededor de la cepa bacteriana sembrada en el medio, estos son medidos en milímetros de diámetro.

Para este caso la medición fue dada por la presencia o ausencia de estos halos en el medio de cultivo, alrededor de las unidades formadoras de colonia.

Se prepararon 4 medios para cada una de las muestras de agua recolectadas en los perfiles costeros.

3.6 PREPARACIÓN DEL AGUA RESIDUAL Y EL PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN

Una vez que se determinaron las mejores condiciones para el crecimiento bacteriano, y se realizaron las pruebas para determinar la actividad proteolítica, se procedió a la biorremediación de aguas residuales con alta salinidad (Figura 9).



Este experimento fue realizado en laboratorio, para el cual se preparó agua residual sintética en diferentes concentraciones para determinar la carga contaminante óptima para el estudio. En el agua se añadieron las bacterias que se desarrollaron en el medio líquido, se utilizó un lecho compuesto de una

manguera corrugada de media pulgada cortada en segmentos de aproximadamente 3 cm, y tapas de botellas para dar un soporte en el que las bacterias puedan realizar sus procesos degradativos en presencia de aireación constante en el agua.

El agua residual sintética con alta salinidad utilizada para la remediación estuvo compuesta de melaza diluida, urea, fosfato de potasio (KH_2PO_4), sulfato de magnesio (MgSO_4), y diferentes concentraciones de sal (1-5%) (Kargi, 2002, p 1570), los componentes para el agua se encontraban inicialmente en una proporción de carga orgánica, nitrógeno y fósforo de 100:10:1, con esta proporción se determinaron estas cantidades de los compuestos para 1 litro de agua residual:

Tabla 5. Componentes del agua residual sintética

Compuesto	Cantidad
Melaza	100 mL
Urea (Solución)	10 mL
KH_2PO_4	0,1 g
MgSO_4	0,1 g

Esta formulación tuvo una concentración muy elevada, por lo que se procedió a realizar diluciones de la fórmula.

Con las diferentes concentraciones, se realizaron simultáneamente los experimentos para determinar en qué condiciones trabajan mejor las bacterias halófilas, mediante mediciones de la degradación de los contaminante. Siendo la mezcla de 800 ml de agua y 200 ml de la fórmula, la que mostró mejores resultados y por lo tanto, la que más adelante fue utilizada para todos los análisis realizados para determinar el funcionamiento del proceso de remediación de aguas.

3.7 MICROORGANISMOS HALÓFILOS PARA BIORREMEDIACIÓN

Para la biorremediación de las aguas residuales sintéticas, se usaron microorganismos que se encontraron previamente en crecimiento en medio líquido dentro de una incubadora, las mismas que fueron cambiadas a medio fresco cada semana para garantizar que se encuentren en una fase exponencial de crecimiento y su degradación sea mayor.

Antes de colocar las bacterias en el agua residual, se determinó si las mismas se adaptaban al lecho plástico, para lo cual se las colocó en un vaso junto con este material.

Las bacterias que se encuentran con el lecho plástico, son regresadas a la incubadora y se las dejó crecer en este nuevo ambiente por 48 horas.



Figura 10. Lecho plástico con biofilm

Este lecho plástico serviría a las bacterias a tener una mejor y mayor superficie de contacto para poder realizar sus funciones vitales y crear consorcios

bacterianos, debido a que por la presencia de sal, los organismos que ayudan a cumplir esta función no pueden sobrevivir.

3.8 BIOREMEDIACIÓN DE AGUAS RESIDUALES

Se realizaron varios experimentos con las diferentes concentraciones de agua residual sintética, para determinar las condiciones óptimas de contaminantes, bacterias, sal y tiempo para obtener el tratamiento más efectivo.

Para este proceso se colocó el lecho plástico, el cual estuvo previamente en contacto con las bacterias, en un frasco Erlenmeyer, junto con 100 ml del caldo de cultivo de bacterias. A este lecho se le agregó 1 litro del agua residual sintética, y se le inyecta aire mediante una pequeña bomba para pecera.

A este tratamiento se lo deja en aireación constante durante 72 horas para medir el efecto de las bacterias sobre la carga contaminante contenida en el agua residual.

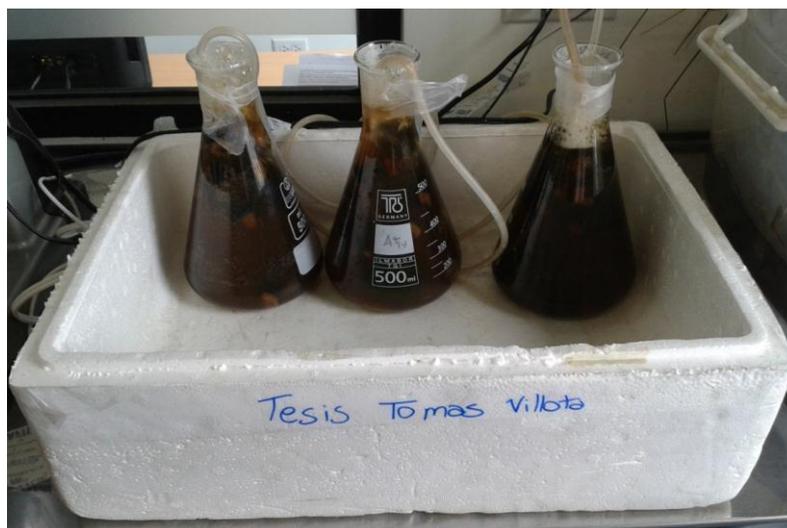


Figura 11. Tratamiento de aguas residuales mediante bacterias aerobias

3.8.1 Coagulación – floculación de agua residual producto de la biorremediación

Una vez finalizado el proceso de remediación con las bacterias halófilas aerobias, las diferentes muestras de agua residual fueron llevadas a un cono de sedimentación para visualizar el cambio en la turbidez del agua mediante la sedimentación de los sólidos suspendidos que se forman por la presencia de bacterias en el agua residual sintética, y la alta carga orgánica. El agua incremento su turbidez por los sólidos en suspensión que se generaron.

El agua debe permaneció en reposo dentro del cono por una hora para determinar la sedimentación.

En todos los tratamientos realizados, los sólidos suspendidos, se quedaron en ese estado y no sedimentaron de la forma esperada, debido a esto, los parámetros medidos incrementaron significativamente, en lugar de decaer por lo que no se pudo determinar el éxito del tratamiento de agua residual con alta salinidad.

Por esta razón se decidió incluir un tratamiento de coagulación – floculación a este experimento, para el que se agregó productos químicos para ayudar a la sedimentación de la materia en suspensión, que de otra forma no sedimentaría por la presencia de las sales inorgánicas en el agua residual(Lafabvre & Moletta, 2006, pág. 3674).

Los productos usados en el tratamiento fueron:

- Coagulante PCA al 20%
- Floculante aniónico al 0,1%



Figura 12. Aguas tratadas con bacterias antes y después del tratamiento terciario

Una vez finalizados los tratamientos aerobios con bacterias halófilas, se tomaron 500 ml del agua cada uno de los tratamientos y se los colocó en vasos para poder realizar la prueba de jarras, el cual consiste en colocar los vasos con las muestras de agua y someterlos a una agitación constante por un tiempo determinado y colocar los agentes coagulantes (10 ml) y floculantes (6 ml), para de esta manera determinar la dosis óptima para la precipitación de la materia coloidal contenida en el agua tratada.

Se utilizaron las mismas dosis de PCA y floculante aniónico en todas las fases del tratamientos (inicial, con bacterias y coagulación – floculación), debido a que este proceso se realizó como complemento para observar si el uso de estos componentes daría resultados positivos al problema de sedimentación y turbidez en todos los tratamientos realizados con las diferentes concentraciones.

3.9 PARÁMETROS ANALIZADOS

Para tener datos significativos y reales de la eficiencia del tratamiento descrito en el estudio, se ejecutaron mediciones de algunos parámetros de calidad y estado del agua antes y después del tratamiento, tanto al agua salida del tratamiento aerobio como a la que fue agregada el coagulante y el floculante. Los parámetros analizados fueron los siguientes:

- Sólidos sedimentables
- Sólidos suspendidos
- Turbidez
- Demanda química de oxígeno (DQO)

3.9.1 Sólidos sedimentables

Los sólidos sedimentables son la materia que se depositan en el fondo de un cono de precipitación en un periodo determinado de una hora. El volumen que debe ser usado es de 1 litro y se determina midiendo el volumen de material coloidal en mililitros que sedimenta durante la hora determinada. A los 45 minutos de este proceso, se deben realizar giros al cono, para ayudar a que los sólidos precipiten de una manera más rápida.

La medición se realiza a los 60 minutos, esta es realizada midiendo los mililitros que alcanzó la parte de material sólido en el cono, el cual cuenta con graduación en mililitros para obtener rápidamente la cantidad sedimento alcanzado por esta fracción sólida (Aguinaga, 1996, p 11).

Existen dos maneras posibles para medir los sólidos disueltos, en mg/L y en ml/L, en este estudio se midió de la segunda forma, la cual es una medida de volumen sobre volumen, debido que para este tipo de industria esta es la medida que se calcula en las normativas.



Figura 13. Sedimentos en el cono Imhoff

En el caso de este experimento, este parámetro sirvió para observar la actividad microbiana, mediante el aumento de la materia orgánica en el fondo del cono.

3.9.2 Sólidos suspendidos

Como indica su nombre, con este método se analizó la materia que se encuentra suspendida en el agua, y no puede precipitar. En este caso a la presencia de sal, crea un efecto de alta turbidez en el agua tratada. La unidad medida de este parámetro es medido en mg/L.

El primer paso es el de secar por 1 hora el filtro de fibra de vidrio dentro de la mufla a una temperatura de 105 °C por dos horas, tras sacar el filtro, este es pesado en la balanza analítica dentro de la caja Petri para determinar su peso inicial (Aguinaga, 1996, p 13).

El matraz Kitasato es conectado mediante una manguera a la bomba de succión y sobre el colocamos el embudo. En el embudo se pone el filtro de fibra de vidrio, y se hace pasar poco a poco 100 ml del agua residual por el filtro, mientras esta agua es succionada dentro del matraz(Aguinaga, 1996, pág. 13).

Una vez filtrados los 100 ml de agua, el filtro se retiró del embudo y colocó de nuevo en la caja Petri para ser introducido en la mufla a la temperatura de 105 °C por el mismo periodo de tiempo, para luego ser pesado.

La diferencia de peso entre el peso inicial del filtro de fibra de vidrio y el peso final se expresa en mg de materia en suspensión por litro de muestra. Se determina mediante la siguiente ecuación:

$$U = \frac{(A-B-C) \times 1000}{\text{Volumen de la muestra}} \quad \text{(Ecuación 2) determinación del peso los sólidos suspendidos}$$

A = peso de la caja Petri con el filtro y los mg de sólidos suspendidos

B = Peso de la caja Petri

C = Peso del filtro

Esta técnica es repetida para el agua de todas las fases del tratamiento de aguas.

3.9.3 Turbidez

Este parámetro determina la disminución del material coloidal en el agua debido a la presencia de partículas en suspensión (Ziegler, 2002, p 1). La turbidez es expresada en unidades nefelométricas de turbidez, o NTU por sus siglas en inglés.

Estas pruebas se realizaron en un medidor de turbidez (turbidímetro) HI 88713 de marca Hanna Instruments, el cual tiene un rango de medición de 0,00 hasta 4.000 NTU.



Figura 14. Turbidímetro

Para realizar las mediciones en las muestras de agua se debe programar el turbidímetro en el modo de lectura. Mientras tanto se debe verter 10 ml de cada muestra que va a ser analizada en pequeños frascos diseñados para el turbidímetro.

El turbidímetro cuenta con una bandeja, diseñada para la lectura de las muestras en los frascos incluidos con el equipo.

Para la lectura de las muestras se limpió el frasco por fuera y se colocó en la bandeja del medidor, se cierra la tapa de la bandeja y se realiza la lectura de la turbidez presionando el botón "leer". Cada lectura es individual, por lo que una vez tomada, se retira el frasco y se coloca el siguiente para realizar el mismo proceso. El proceso de lectura y generación de resultados demora alrededor de 20 segundos por muestra.

3.9.4 Demanda química de oxígeno

Este parámetro ayuda a determinar la carga orgánica contenida en el agua residual mediante la determinación de la cantidad total de oxígeno necesario para oxidar a dióxido de carbono a este material orgánico (Sawyer, McCarthy y Parkin, 2003, p 625). Los resultados de las mediciones de DQO se expresan en miligramos de oxígeno por litro.

Para medir éste parámetro, una muestra del agua residual inicial, una muestra del agua tratada con bacterias y la proveniente del tratamiento terciario, fueron enviadas al laboratorio de aguas "TRAHISA".

Para determinar este parámetro solo se analizaron las aguas en las diferentes etapas de tratamiento de una de las tres réplicas, debido a que el tiempo de entrega de los resultados fue prolongado y que el agua de las tres replicas fue similar.

4. RESULTADOS

4.1 RESULTADOS DE LA TOMA DE MUESTRAS

La toma de muestras de los puntos que se señalan en la sección 3.1, dio como resultado la siguiente tabla en donde se muestran los parámetros físico - químicos que fueron medidos en el momento de la recolección del agua.

Tabla 6. Ficha de toma de muestras

Muestra	Lugar de muestreo	Fecha	Hora	Temperatura (°C)	pH	GPS coordenadas N	GPS coordenadas E
1	Leonidas Plaza	23-mar-13	8:45	26	8	564252	9931318
2	San Vicente	23-mar-13	9:10	28	7	565420	9935371
3	Canoa	23-mar-13	10:05	27	7	560363	9949037
4	Pedernales	23-mar-13	12:12	26	7	604654	0007287

4.2 MAPAS GEORREFERENCIADOS DE LOS PUNTOS DE MUESTREO

Como resultado de la georreferenciación de los puntos de muestreo que aparecen en la tabla 6, se crearon cuatro mapas de los lugares en donde las muestras fueron recolectadas y un mapa general del perfil costero con todos los puntos de muestreo.

El primer mapa (Figura 15) representa al Ecuador con los puntos en donde se realizó los muestreos.

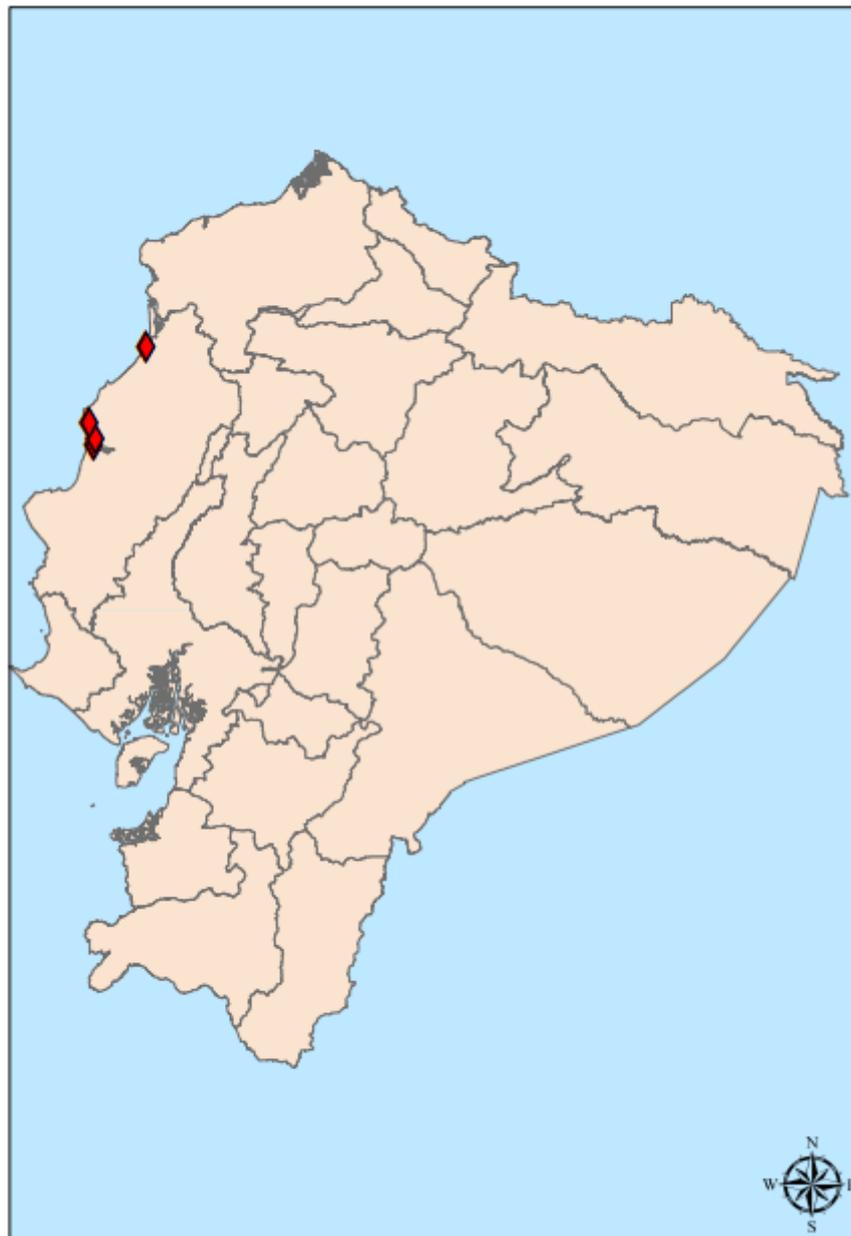


Figura 15. Mapa de Ecuador con los puntos de Muestreo

El mapa de la Figura 16, es un acercamiento a la zona de la provincia de Manabí, en donde se encuentran los puntos de muestreo.

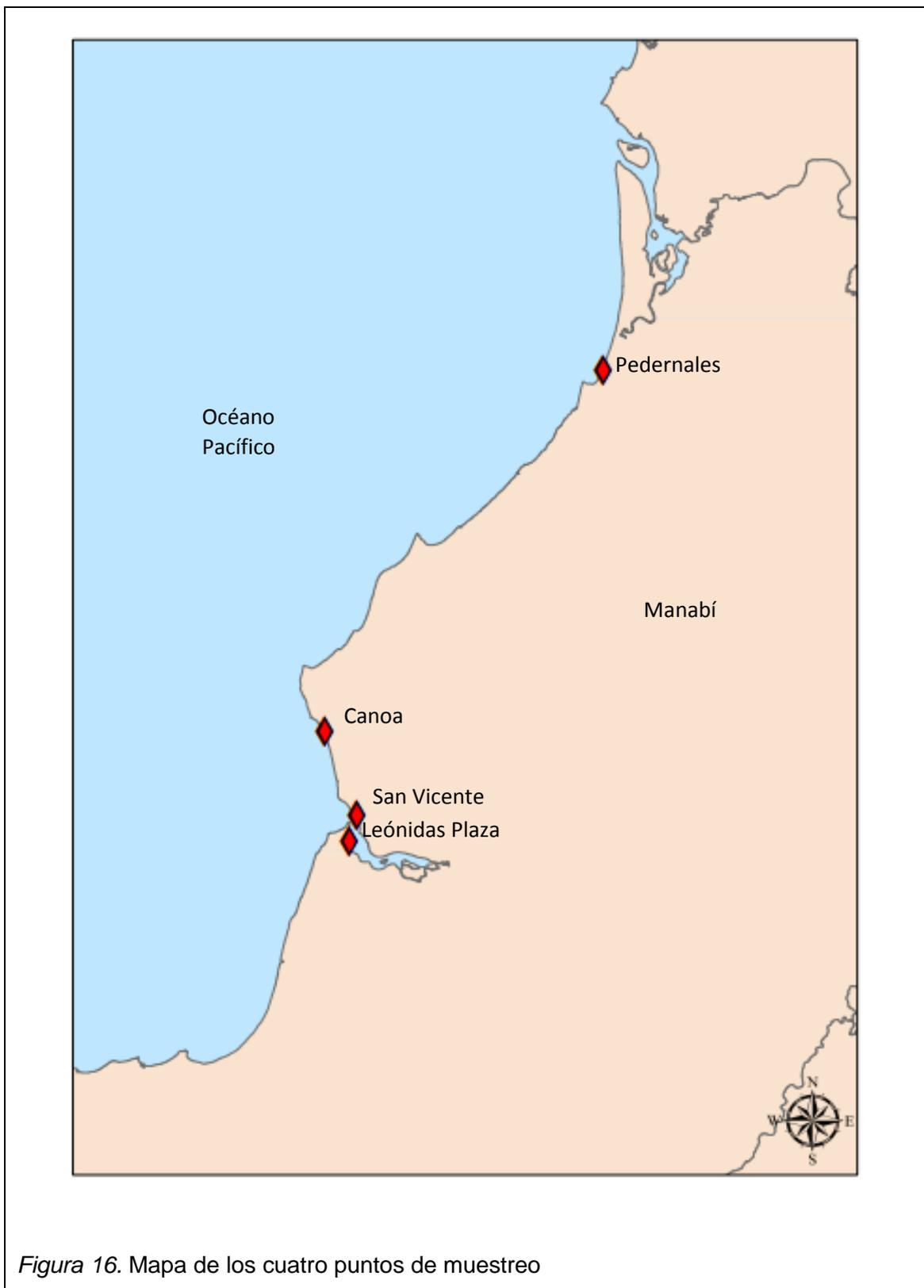


Figura 16. Mapa de los cuatro puntos de muestreo

En la Figura 17 aparece el lugar del primer punto de muestreo, ubicado en la parroquia Leónidas Plaza Gutiérrez.

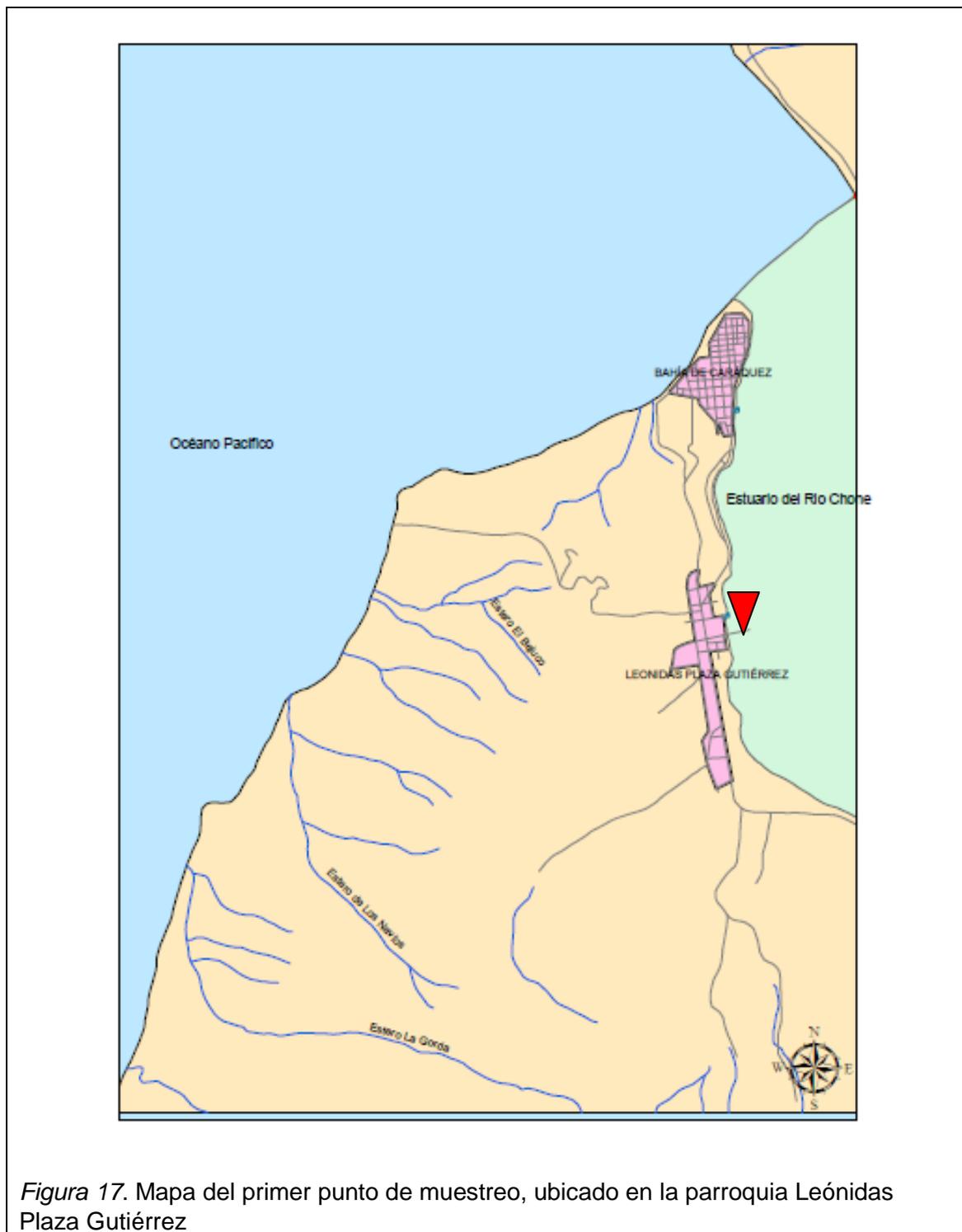


Figura 17. Mapa del primer punto de muestreo, ubicado en la parroquia Leónidas Plaza Gutiérrez

El mapa en Figura 18 representa el punto de muestreo cercano a la parroquia San Vicente.

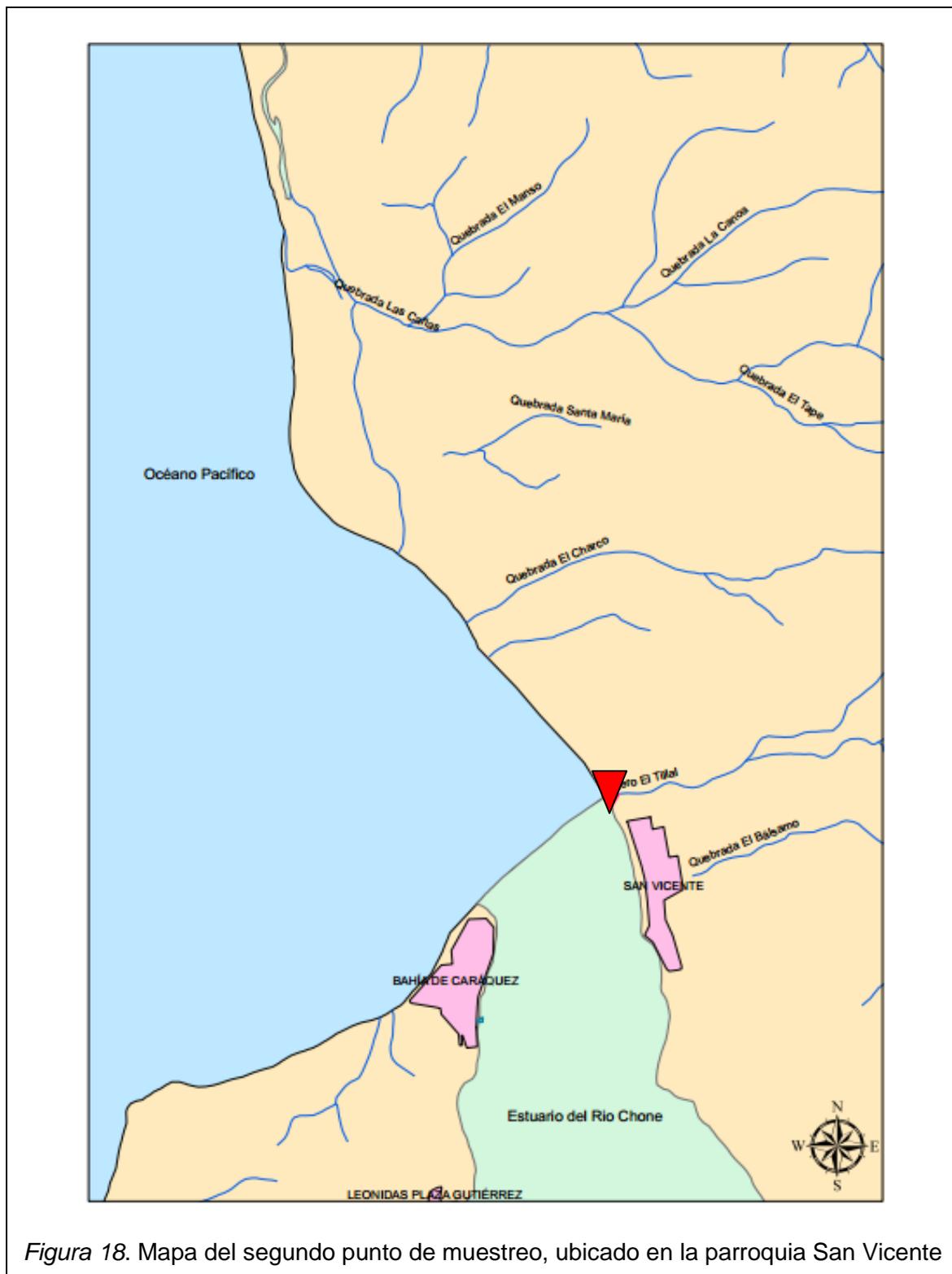


Figura 18. Mapa del segundo punto de muestreo, ubicado en la parroquia San Vicente

En la Figura 19 se encuentra el punto de muestreo realizado en el río Canoa, en la población de Canoa.



Figura 19. Mapa del tercer punto de muestreo, ubicado en la parroquia Canoa.

La última muestra realizada fue la localizada en la ciudad de Pedernales, la cual es descrita en la Figura 20.



Figura 20. Mapa del cuarto punto de muestreo, ubicado en la ciudad de pedernales.

4.3 CONTEO MICROBIANO DE MICROORGANISMOS HALÓFILOS AISLADOS DE PERFILES COSTEROS DE ECUADOR

En la Figura 21 se muestran los resultados de las 12 fórmulas para los medios de cultivo determinados por el diseño Plackett-Burman (sección 3.3.2).

Por medio del método de conteo descrito en la sección 3.3.2 se consiguió la cuantificación del crecimiento de microorganismos halófilos.

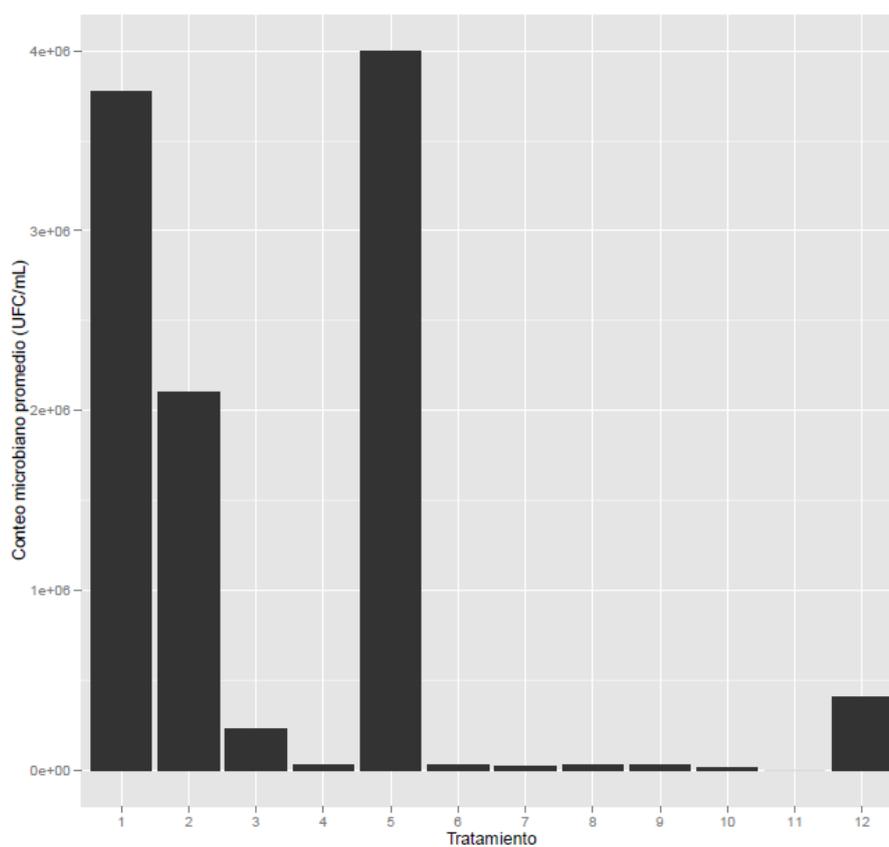


Figura 21. Promedio de colonias bacterianas por fórmula de medio



Figura 22. Caja Petri con microorganismos halófilos (UFC/ml)

4.4 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA

Los resultados para la actividad proteolítica fueron determinados por la presencia o no de halos de degradación de proteínas alrededor de las cepas microbianas aisladas que crecieron en el medio.

En la Tabla 7, se muestran los resultados de la presencia o ausencia de degradación de proteínas de leche sin grasa mediante la aplicación de diferentes cultivos aislados de las muestras de agua de los perfiles costeros.

La muestra tomada en Leónidas Plaza Gutiérrez corresponde a M1, San Vicente a la muestra M2, Canoa a M3 y M4 es la muestra recolectada en Pedernales.

Tabla 7. Presencia de actividad proteolítica por muestra

DEGRADACIÓN	
M1	SI
M2	SI
M3	NO
M4	SI

4.5 BIORREMEDIACIÓN DE AGUA RESIDUAL SINTÉTICA

En esta sección se muestran los resultados de biorremediación realizados al agua residual sintética (sección 3.6). Se midió la concentración de sólidos sedimentables (ml/L), sólidos suspendidos (mg/L), turbidez (NTU) y demanda química de oxígeno: antes del tratamiento, al finalizar la fase de tratamiento con bacterias aerobias y después del tratamiento mediante coagulación - floculación. Estos análisis fueron realizados en agua residual sintética seleccionada: 800ml de agua y 200 ml de la fórmula concentrada (sección 3.6), debido a que los resultados que se registraron en un principio fueron los mejores.

La Figura 23, representa el análisis de sólidos sedimentables, para las tres réplicas, realizado en el proceso de remediación de aguas residuales.

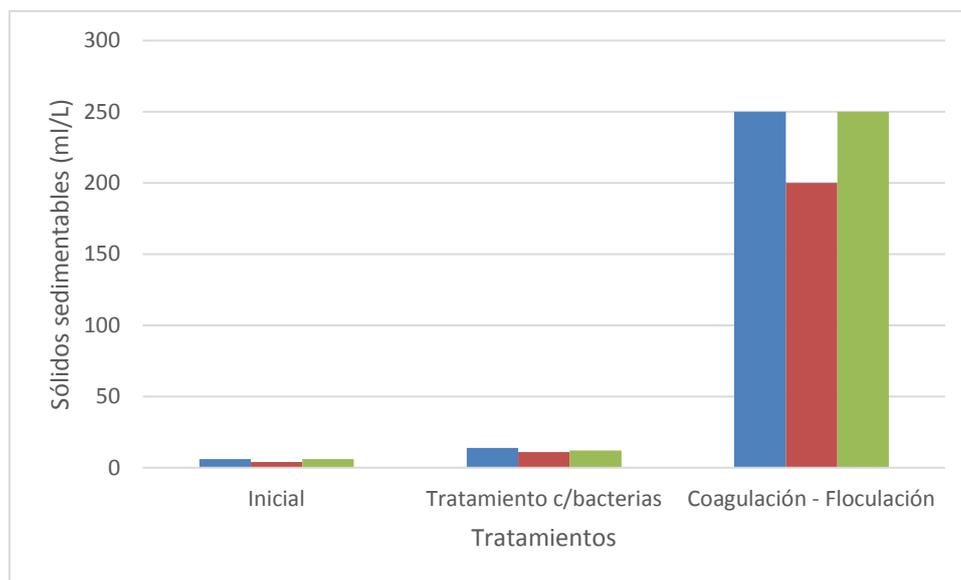


Figura 23. Respuesta del parámetro sólidos sedimentables en agua residual sintética sin tratamiento (inicial) y en los tratamientos realizados.

Los resultados de las réplicas del parámetro sólidos suspendidos se encuentran en la Figura 24.

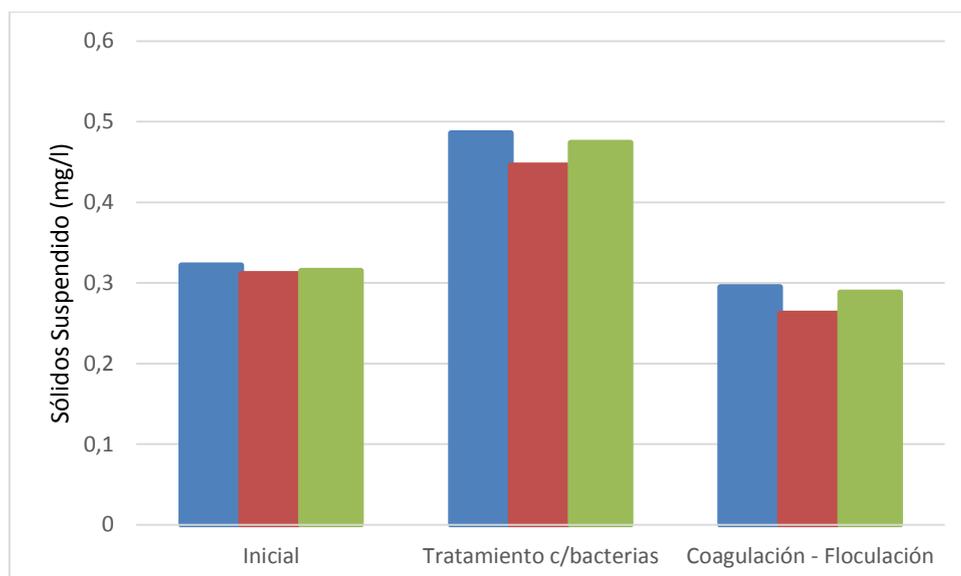


Figura 24. Medición del parámetro sólidos suspendidos para agua residual sintética sin tratamiento, después del tratamiento biológico y el tratamiento de coagulación – floculación.

En la Figura 25 se presentan las variaciones de la turbidez entre las fases del tratamiento del agua residual sintética.

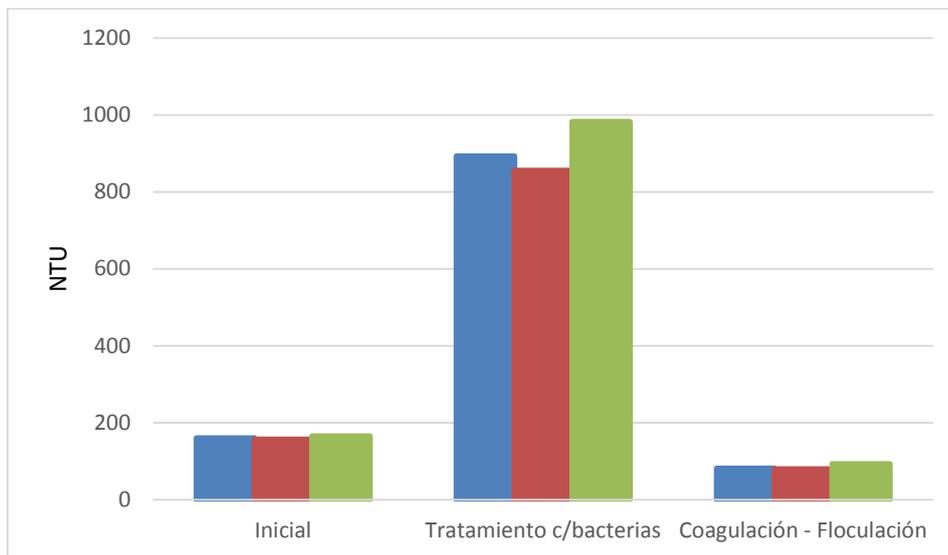


Figura 25. Medición de la turbidez en agua residual sintética sin tratamiento (inicial) y en los tratamientos realizados.

El último parámetro analizado fue la demanda química de oxígeno (DQO), cuyas mediciones se encuentran en la Figura 26.

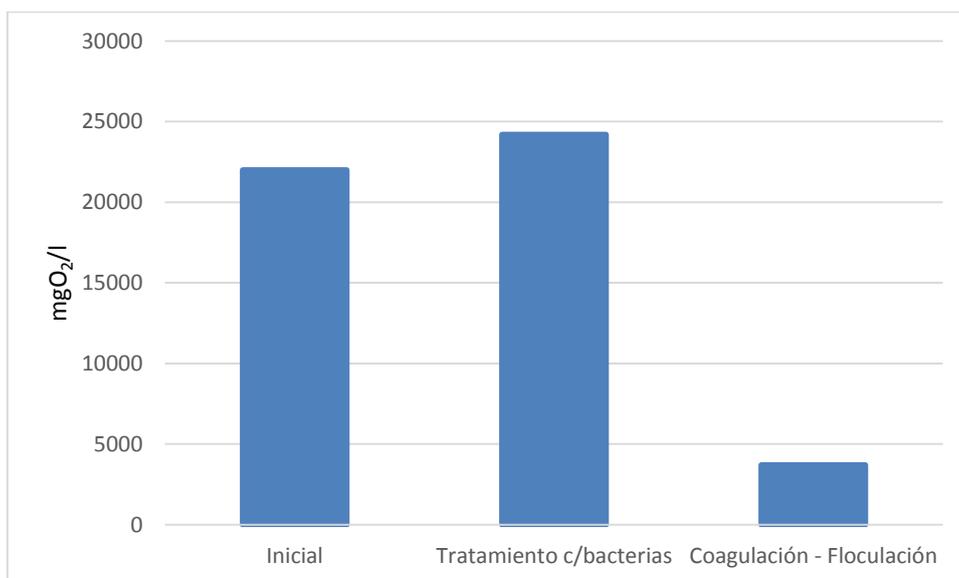


Figura 26. Medición del parámetro Demanda Química de Oxígeno para el agua residual sintética en los tratamientos de remediación.

5. ANÁLISIS DE RESULTADOS

En este capítulo se analizan los resultados obtenidos en los experimentos realizados para este estudio, siendo los elementos a analizar el crecimiento bacteriano en cada uno de los medios, los efectos de los compuestos utilizados en los diferentes medios, la actividad proteolítica y los resultados de los análisis realizados en el tratamiento agua residual sintética con alta salinidad.

5.1 ANALISIS DEL CRECIMIENTO MICROBIANO

Los resultados del conteo de colonias microbianas que se muestran en la Figura 21 del capítulo anterior nos permiten observar que el mayor número de cepas fue encontrado en la fórmula 5 con 400.000 UFC/ml, seguido por la fórmula 1 en la que se obtuvieron un promedio de 376.666,7 UFC/ml y la fórmula 2 con 210.000 UFC/ml colonias en promedio, con estos resultados se decidió el uso de estas fórmulas para el crecimiento bacteriano y la remediación de aguas residuales con alta salinidad.

La fórmula 5, compuesta por 0,9g de $MgSO_4$, 0,6g de extracto de levadura, 0,1g de peptona, 0,02g de $CaCl$, 0,9g de NH_4Cl , 3,75g de $NaCl$ y la muestra de Leónidas Plaza, en un principio parece ser la que mejores resultados, pero para obtener resultados más puntuales, se realizó el análisis estadístico de estos resultados.

5.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL CRECIMIENTO MICROBIANO APLICANDO PLACKETT – BURMAN

5.2.1 Análisis de los efectos principales

En esta sección se muestran cuáles son los compuestos y condiciones utilizados para el crecimiento bacteriano que causan un mayor impacto en el crecimiento. Estos efectos son presentados en la Figura 27.

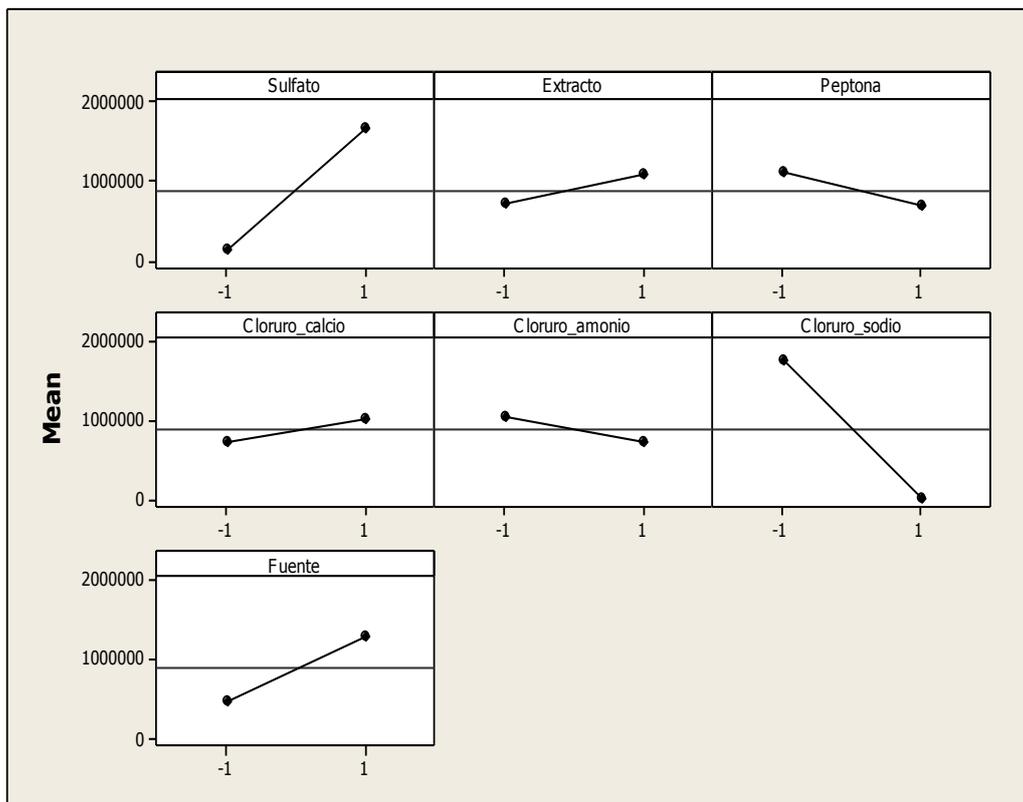


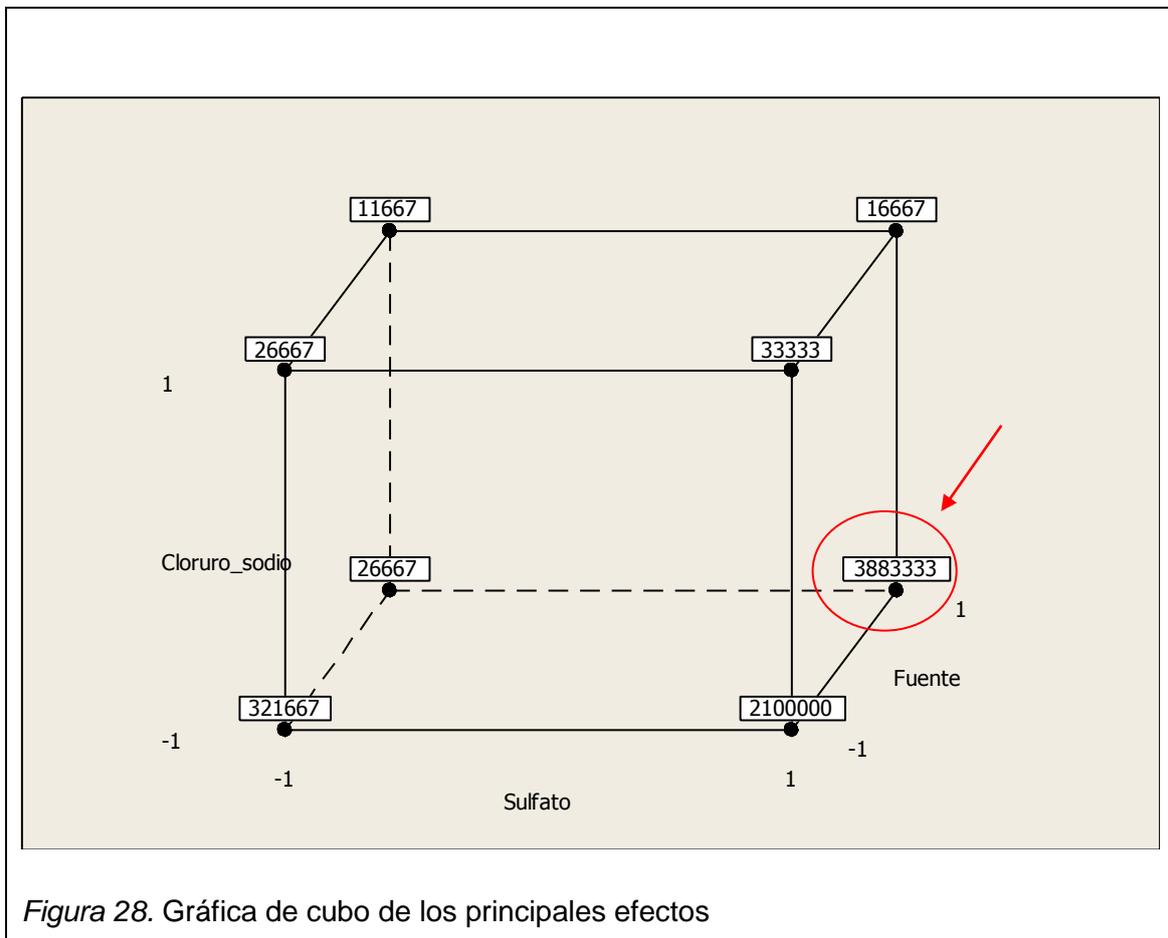
Figura 27. Gráfica de efectos principales del promedio del conteo microbiano

En la gráfica de efectos principales se observa que las pendientes de los compuestos sulfato de magnesio y el cloruro de sodio son las más inclinadas, lo que indica en primera instancia que estos son los compuestos más influyentes. El mayor efecto del uso del sulfato se da en el nivel alto, lo mismo ocurre para el extracto de levadura y cloruro de calcio. Los compuestos que muestran efectos mayores con el nivel bajo son peptona, cloruro de amonio y cloruro de sodio. La fuente que presenta mejores resultados de crecimiento fue la tomada en la parroquia de Leónidas Plaza Gutiérrez.

El máximo crecimiento de microorganismos halófilos ocurre en presencia de iones de magnesio, ya que los iones de este elemento sirven como estabilizadores de las membranas de la célula, reduciendo su permeabilidad (Brown y Gibbons, 1955, p 486). Mientras que la presencia de sal reduce la presencia de microorganismos por el estrés osmótico producido por la sal

(Lafabvre y Moletta, 2006, p 3674). No obstante, existe un crecimiento de microorganismos en presencia de salinidad, lo que nos indica que se trata de organismos halófilos, los cuales presentan mecanismos para adaptarse a la osmosis producida por la presencia de cloruro de sodio. El mecanismo utilizado por estos microorganismos para resistir estas concentraciones de sal consiste en mantener el citoplasma libre de sodio, al llenarlo de potasio (Kunte, Trüper, y Stan-Lotter).

La Figura 28 contiene una gráfica de cubo, en la que se relaciona los niveles de los tres factores con mayores efectos sobre el crecimiento microbiano para mostrar las interacciones que generaron mejores resultados.



Los mejores resultados para el crecimiento microbiano que se observan en la gráfica de cubo se encuentran en la parte inferior derecha del mismo, la

relación del nivel alto (1) de sulfato y el nivel bajo (-1) de cloruro de sodio y las dos fuentes. El mejor resultado fue 3.883.333 UFC/ml que se registró con la fuente Leónidas Plaza Gutiérrez y la relación descrita de los compuestos cloruro de sodio y sulfato. El otro resultado significativo fue con la misma relación de cloruro y sulfato y la fuente tomada en San Vicente.

Estos resultados confirman la importancia de los compuestos sulfato y cloruro de sodio en el crecimiento bacteriano. Mientras que el mayor crecimiento en la fuente Leónidas Plaza Gutiérrez puede deberse al asentamiento de personas cerca del punto de muestreo.

5.2.2 Análisis de residualidad del diseño Plackett - Burman

En esta sección se analizará la significancia estadística de los factores relacionados.

En la Figura 29 se puede observar la distribución normal de los datos, ya que estos se encuentran distribuidos a lo largo de la recta, a pesar de que existen datos que se alejan, se puede decir que existe una distribución normal del error (De Dios, 2007).

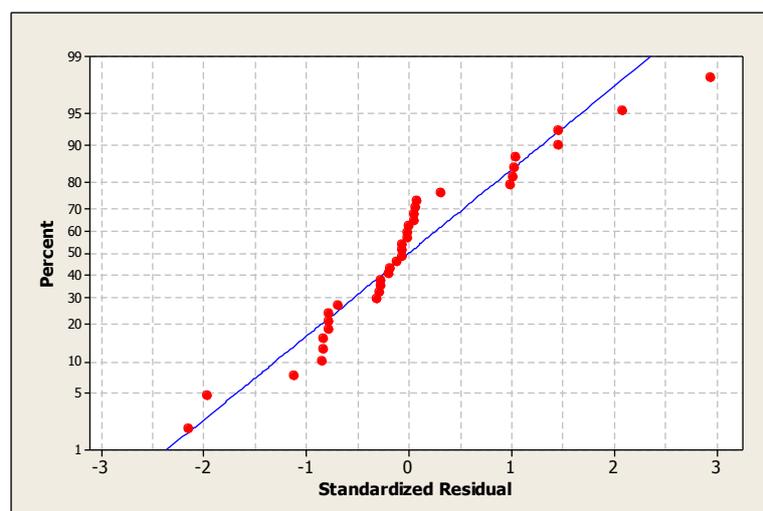


Figura 29. Gráfica de probabilidad normal

En el histograma de la Figura 30 se puede observar que los datos siguen una distribución normal. Debido a que la cantidad de datos utilizados no es tan grande, la curva que se forma no es perfecta. En el mismo observamos que la mayor frecuencia se encuentra sobre el cero, debido a la normalidad de los datos.

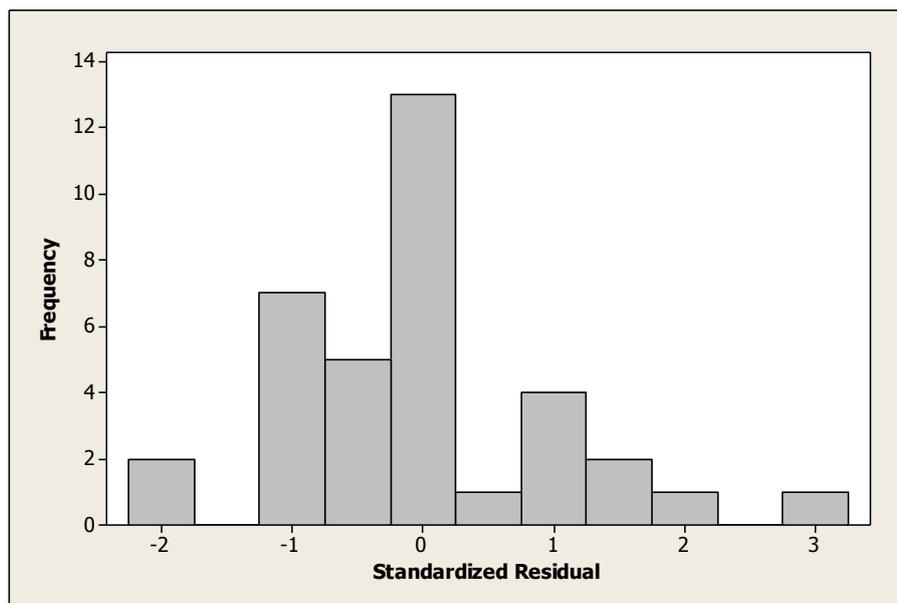


Figura 30. Histograma de frecuencias

En La Figura 31 se puede observar que los datos están distribuidos de forma aleatoria cerca del cero, de la misma manera que se pudo observar en el gráfico de probabilidad normal. Se puede visualizar que existe un dato atípico en el gráfico es el que tiene valor de 600.000 UFC/ml, el mismo que pudo haber ocurrido por un error o contaminación al momento de la siembra, así como pudo ocasionarse una razón.

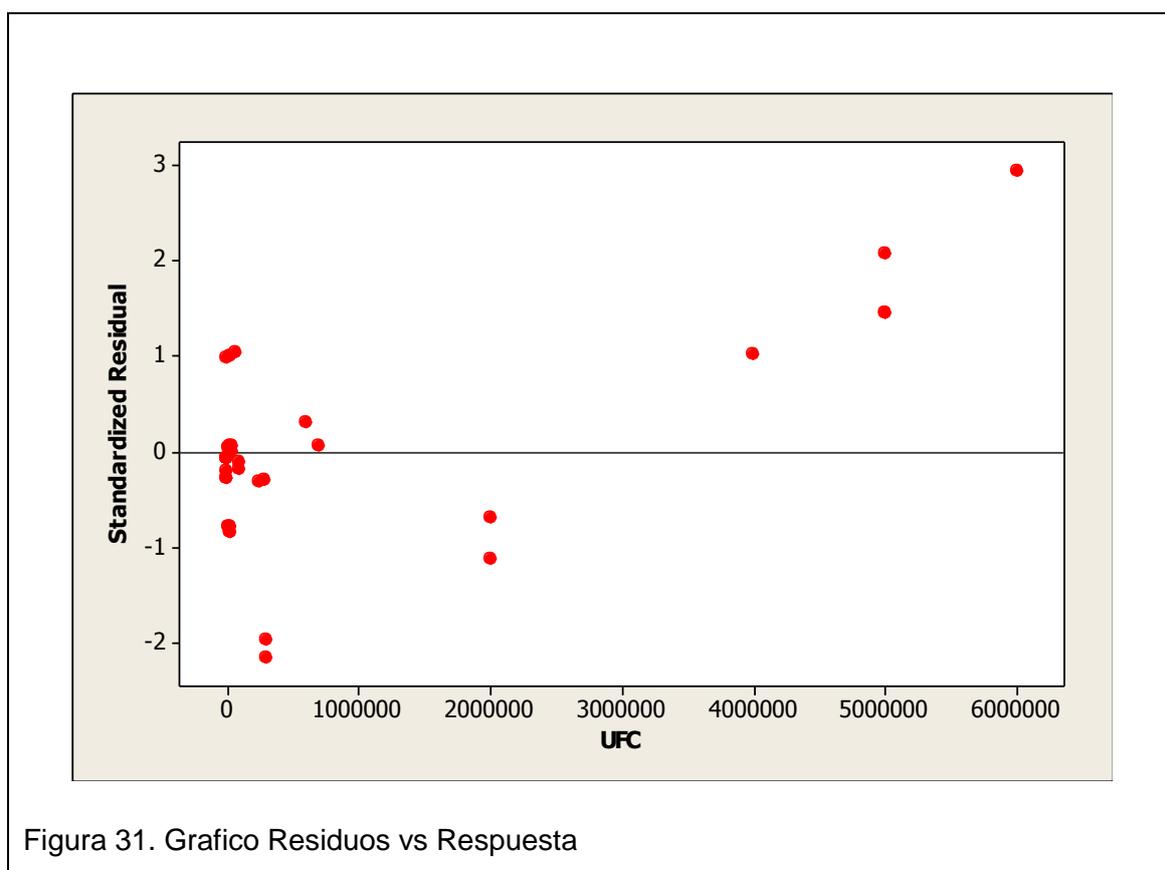


Figura 31. Grafico Residuos vs Respuesta

La Figura 32 muestra que los datos están distribuidos de manera aleatoria en el gráfico y no siguen un orden entre ellos por lo que se puede concluir que son datos independientes unos de otros (Gutiérrez y De la Vara, 2008).

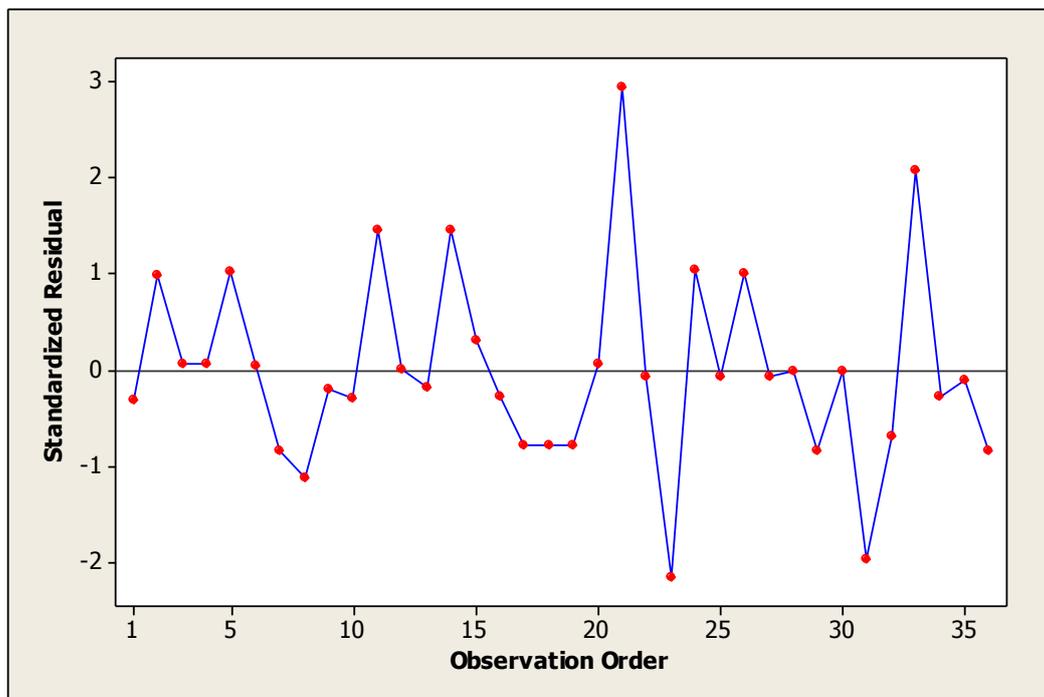


Figura 32. Residuos vs orden de los datos

5.2.3 Análisis de la Varianza (ANOVA)

El análisis de la varianza se realizó en el programa MINITAB versión 16, con los datos obtenidos del diseño Plackett–Burman para evidenciar la existencia de efectos por parte de los compuestos mediante sus medias (De Dios, 2007).

Para este análisis se plantean dos hipótesis:

Ho: $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 \dots \mu_{12}$

Ha: $\mu_1 \neq \mu_n$

Donde μ representa a las medias muestrales correspondientes a los tratamientos 1, 2, 3, 4, 5,....12

Tabla 8. Análisis de la varianza

Fuente	GL	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	p
Efectos principales	7	5,90E+13	5,90E+13	8,42E+12	4,83	0,001
Sulfato	1	2,13E+13	2,13E+13	2,13E+13	12,22	0,00 *
Extracto	1	1,11E+12	1,11E+12	1,11E+12	0,64	0,43
Peptona	1	1,48E+12	1,48E+12	1,48E+12	0,85	0,36
Cloruro de calcio	1	7,66E+11	7,66E+11	7,66E+11	0,44	0,51
Cloruro de amonio	1	9,97E+11	9,97E+11	9,97E+11	0,57	0,46
Cloruro de sodio	1	2,71E+13	2,71E+13	2,71E+13	15,53	0,00 *
Fuente	1	6,24E+12	6,24E+12	6,24E+12	3,58	0,07

*Efectos estadísticamente significativos

Se utiliza el valor de p obtenido en el análisis y un $\alpha = 0.05$ para aceptar o rechazar la hipótesis. Si $\alpha > P$ la hipótesis nula se rechaza y se acepta que existe una diferencia significativa.

En la Tabla 8 se observa que los resultados significativos ($P < 0.05$), son una vez más los compuestos sulfato de magnesio y cloruro de sodio.

5.3 ANÁLISIS DE LOS EFECTOS DE LOS FACTORES EN EL CRECIMIENTOMICROBIANO

A continuación se analizan los compuestos utilizados en las diferentes fórmulas de los medios de cultivo con relación a los efectos que tuvieron en el crecimiento de microorganismos en estos medios.

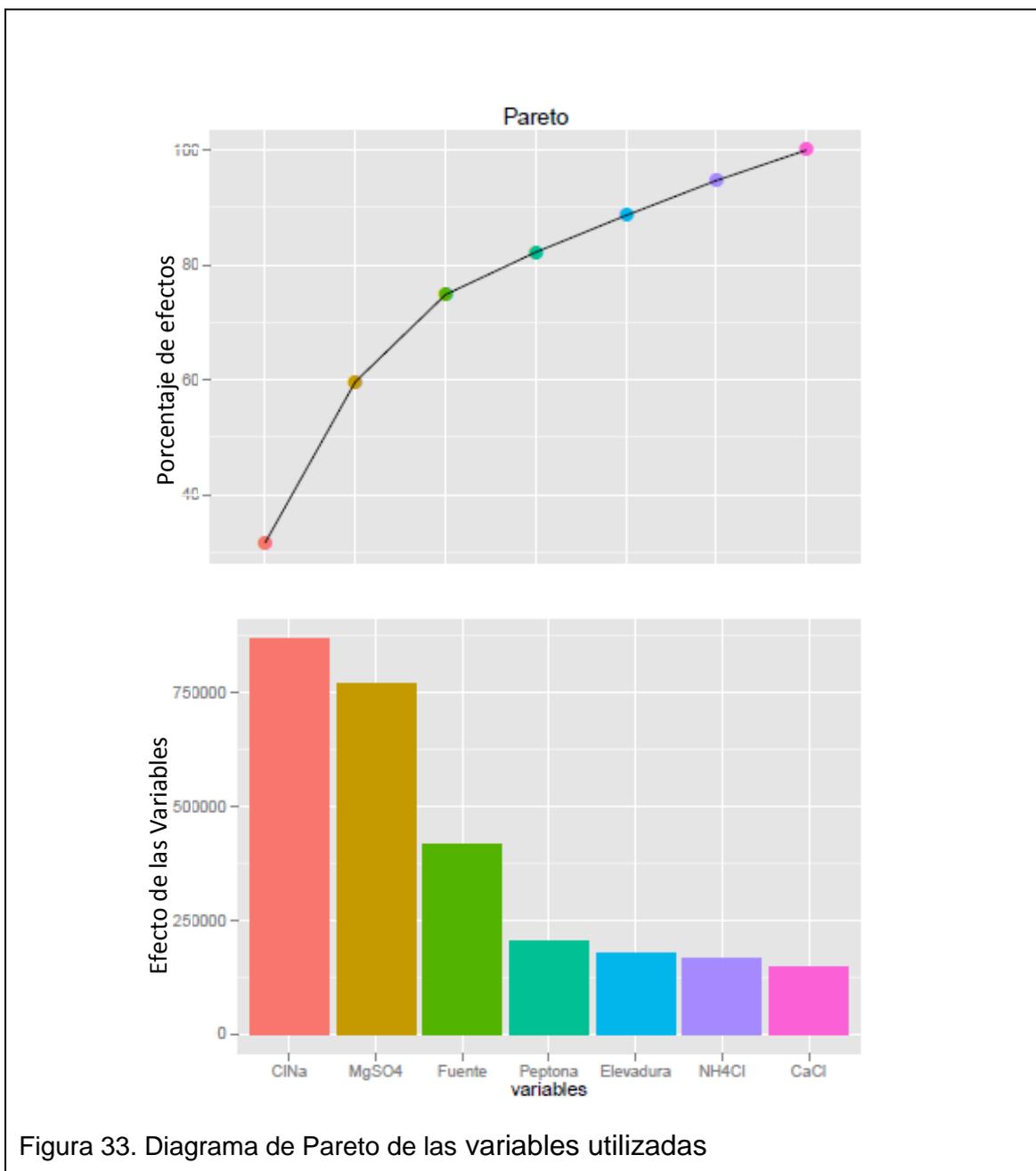


Figura 33. Diagrama de Pareto de las variables utilizadas

El diagrama de efectos (Pareto) de la Figura 33, indica que el 60% de los efectos que se muestran en el crecimiento bacteriano en los medios de cultivo fueron realizados por los compuestos NaCl y $MgSO_4$, un 15% de los efectos fue por las diferentes fuentes, y el 25% restante por la sumatoria de los demás compuestos.

La Figura 34 nos indica que los compuestos utilizados con sus efectos. Los efectos cercanos a la línea no son significativos, mientras que los más alejados son los que tienen efectos significativos sobre la respuesta. En este caso los datos significativos son los correspondientes a sulfato y cloruro de sodio.

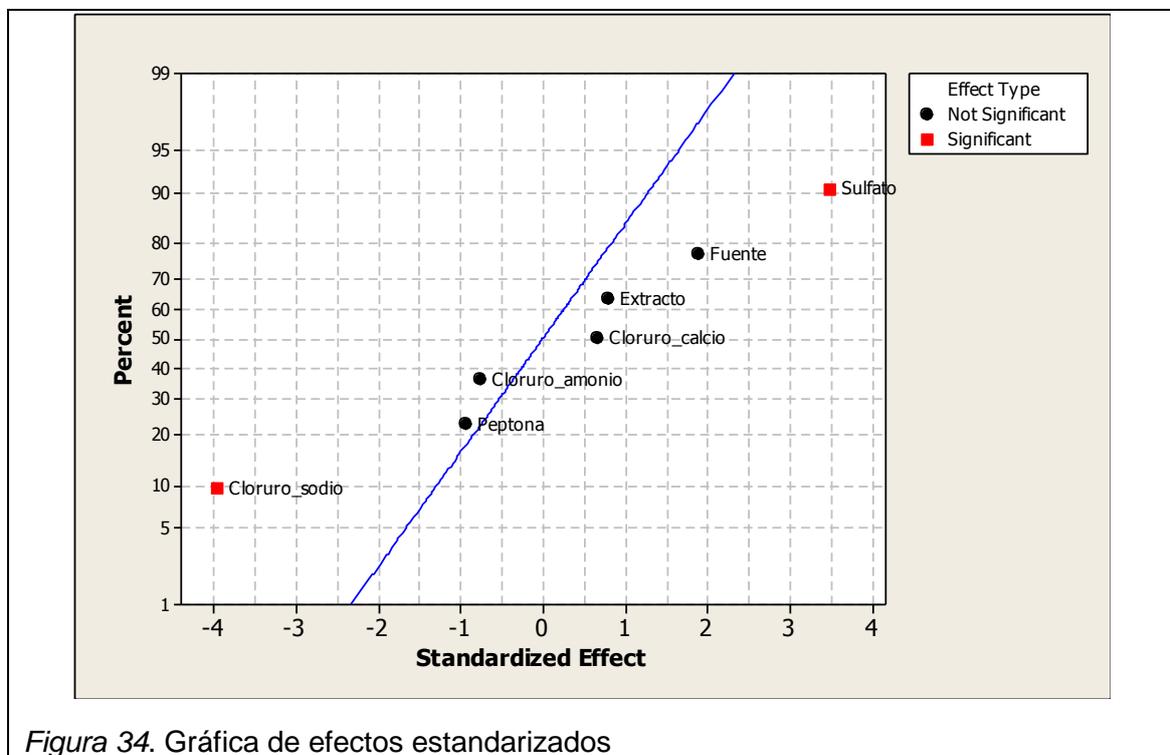
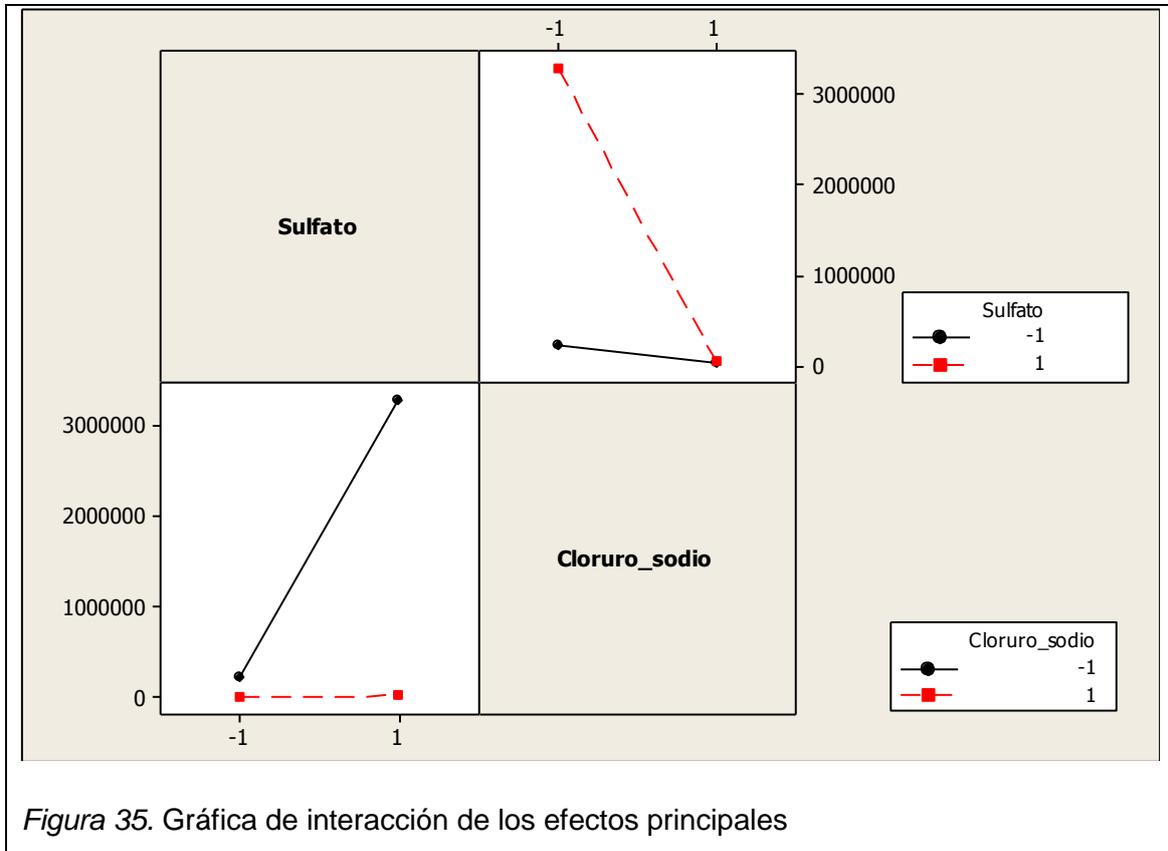


Figura 34. Gráfica de efectos estandarizados

Este análisis sobre los efectos se puede corroborar en la Figura 27, en la cual se muestran individualmente el efecto que presentan cada uno de los compuestos utilizados en las fórmulas en sus diferentes niveles. Siendo los que presentan mayores efectos entre sus niveles, los datos correspondientes a cloruro de sodio y sulfato.

La Figura 35 muestra los efectos por niveles de los compuestos que arrojaron datos significativos (sulfato de magnesio y cloruro de sodio).



Los mejores resultados del componente sulfato se observaron siempre que se utilizó el nivel alto (1), por la característica mientras que el cloruro de sodio otorgó los mejores resultados con el nivel bajo (-1). Esto se puede deber a los efectos que tienen los compuestos sulfato de magnesio, el mismo que brinda una gran estabilidad a la pared celular, y el cloruro de sodio, que en grandes cantidades inhibe el crecimiento de las células.

Gracias a los gráficos anteriores podemos enfocarnos en los compuestos y los niveles que tienen mayor efecto para encontrar las mejores interacciones entre ellos para conseguir los mejores resultados de crecimiento. Esto es explicado con las siguientes figuras.

En la Figura 37 se observa la relación entre los factores cloruro de sodio y sulfato de magnesio (significativos), con sus niveles y con el crecimiento de microorganismos promedio que se encontró en cada tratamiento

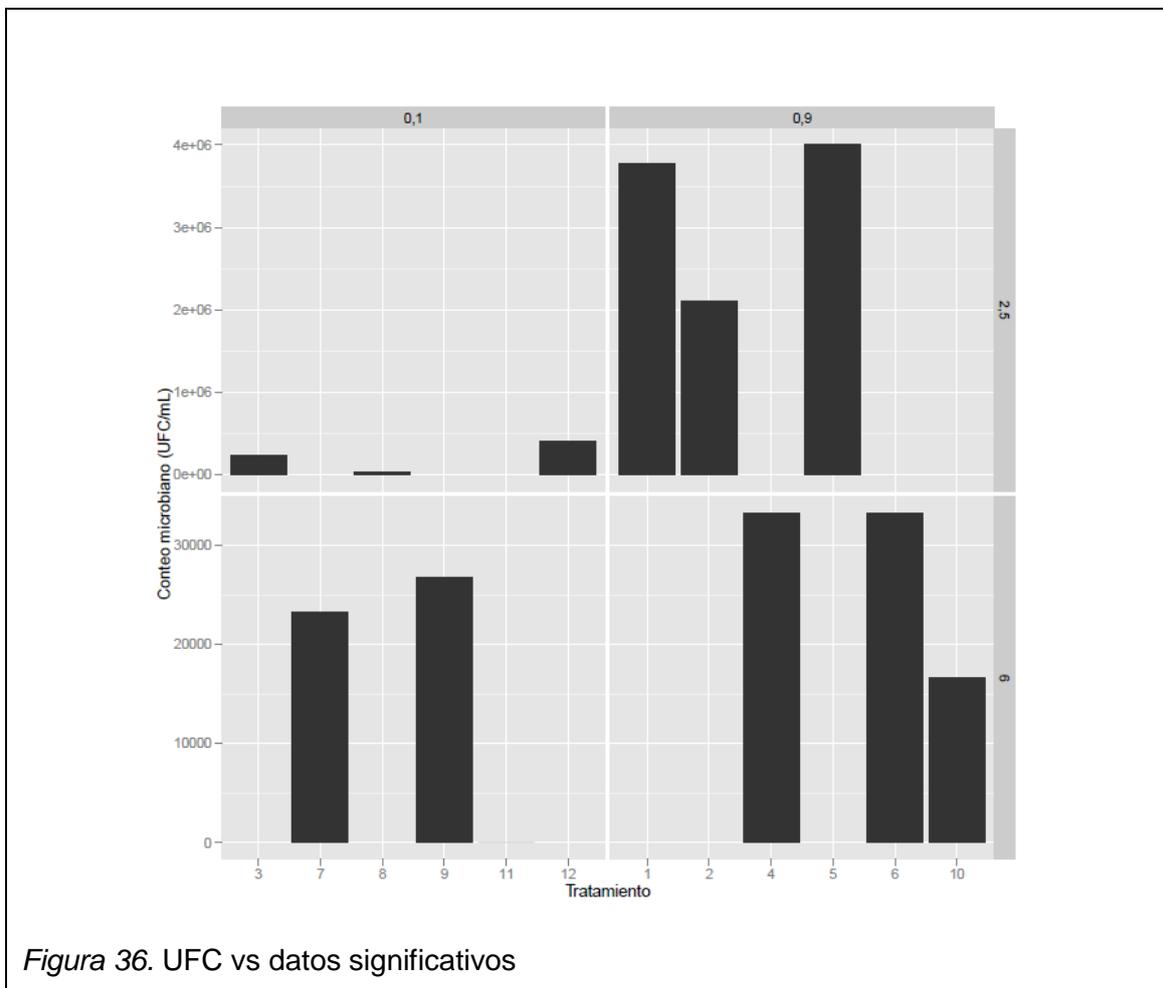
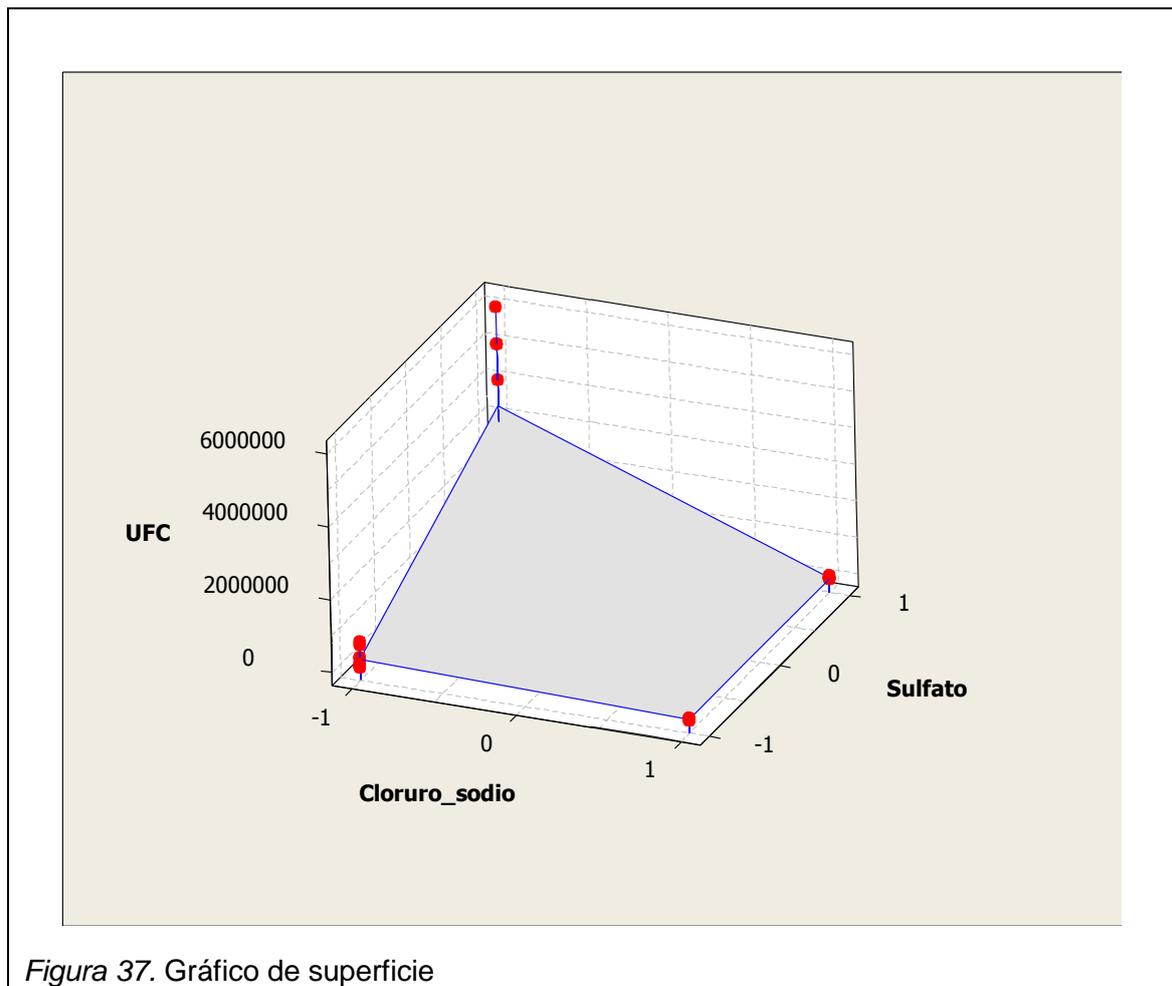


Figura 36. UFC vs datos significativos

En la Figura 36, el gráfico de barras representa el promedio de unidades de colonia observadas en la sección de resultados, pero en este caso se encuentran agrupadas según el nivel utilizado de los componentes significativos. Se observa que el mayor crecimiento se da en la interacción entre 0,9g de sulfato de magnesio y 2,5% de cloruro de sodio, en esta interacción se consiguen valores de hasta 4e+06 UFC/ml (400.000). El menor crecimiento se encuentra en la interacción entre 0,1g de sulfato de magnesio y

6% de concentración de cloruro de sodio. Esto confirma la importancia de los iones de magnesio en la célula y los efectos del cloruro de sodio.

El gráfico de superficie de respuesta en la Figura 37 expone la relación de los niveles de los datos significativos de cloruro de sodio y sulfato de magnesio con la variable respuesta, expresada en unidades formadoras de colonia (UFC/ml).



En este gráfico se aprecia una vez más que para obtener el mayor número de colonias bacterianas se debe utilizar la combinación del nivel alto de sulfato de magnesio y el nivel bajo de cloruro de sodio. Esto se debe a las propiedades de los iones de magnesio en las membranas y la adaptación al medio que presentan los organismos halófilos.

A continuación, se expone un gráfico de contorno, en los que se puede visualizar mediante relaciones de los compuestos y niveles, cuál es la respuesta de UFC esperada en los diferentes casos.

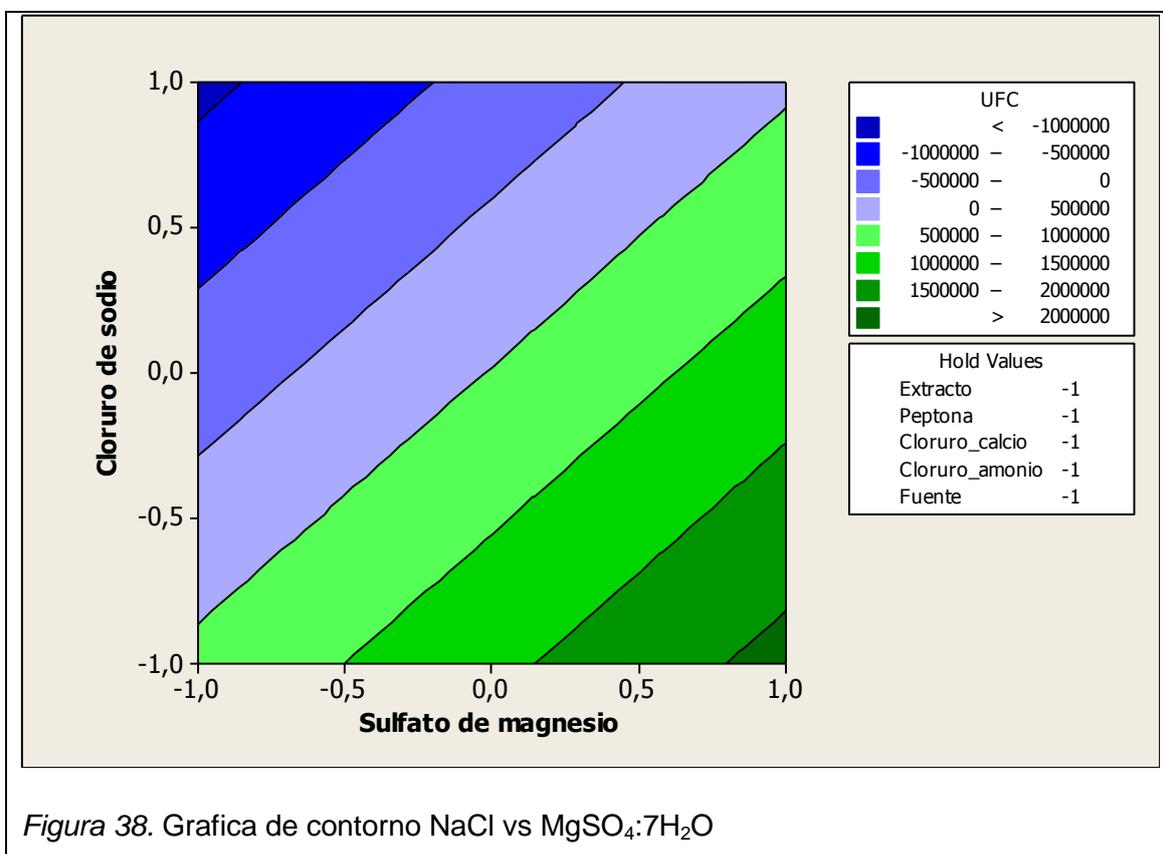


Figura 38. Grafica de contorno NaCl vs $MgSO_4 \cdot 7H_2O$

En la Figura 38 se observa en el eje y los niveles de cloruro de sodio y en el eje x el sulfato de magnesio, mientras el resto de componentes utilizados en el diseño experimental se mantiene en el nivel bajo de cada uno de ellos. En color azul se encuentran valores pequeños o nulos de UFC y en color verde los resultados con mayor número de colonias, lo que se busca obtener en el estudio.

Como en gráficos anteriores la mejor respuesta se obtiene con la combinación de nivel 1 en sulfato de magnesio y -1 de cloruro de sodio.

5.5 ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA

Los resultados de la actividad proteolítica se presentaron en el capítulo anterior como la presencia o no de degradación de las proteínas en el medio creado para este fin. La degradación de proteínas de leche se presentó en 3 de las 4 muestras.

Los microorganismos de las muestras tomadas en: Leónidas Plaza Gutiérrez, San Vicente y Pedernales presentan degradación en el medio de cultivo, por lo que pueden ser utilizadas para remediación de aguas residuales que contengan una carga orgánica que incluya cadenas proteínicas. La muestra de Canoa presentó crecimiento bacteriano pero no los halos de degradación sobre las proteínas, por lo cual no es conveniente utilizarlas en el experimento de remediación de aguas residuales con alta salinidad (Narváez, 2007, p 2).

5.6 ANÁLISIS DE RESULTADOS DE LOS PARÁMETROS MEDIDOS EN EL AGUA RESIDUAL Y TRATADA

Los parámetros realizados para determinar la biorremediación del agua determinan el funcionamiento o no del tratamiento del agua por parte de las bacterias aerobias resistentes a la salinidad.

5.6.1 Sólidos Sedimentables

Los sólidos sedimentables obtenidos en las muestras de agua antes, durante y después del tratamiento, varían en forma considerable tras la aplicación del coagulante y floculante.

Se observa que antes del tratamiento biológico el agua presenta muy poca sedimentación. Cuando se incorporan las bacterias esta sedimentación aumenta en un promedio de 7 ml/L en los tres tratamientos, esto se debe a la presencia de microorganismos degradadores en el agua que se encuentran realizando sus funciones en este nuevo medio. Debido a las sales del medio, estos microorganismos y sus residuos no precipitan de manera óptima, lo cual

se evidencia al agregar el coagulante y el floculante. Con este tratamiento los sólidos sedimentables se incrementan en más de 200 ml/L y se nota un gran cambio en el color y turbidez del agua.

La medición de sólidos sedimentables en estas tres etapas también muestra los problemas asociados a la sedimentación por presencia de las sales en el agua (Dan, 2001, p 15), y la importancia de realizar el tratamiento terciario.

En la Figura 39 observamos que la sedimentación entre el agua en estado inicial y el tratamiento biológico existió una variación en la sedimentación del 57% por el incremento de biomasa sedimentable, mientras que entre el tratamiento de biológico y el de coagulación-floculación la sedimentación obtuvo una variación del 95%.

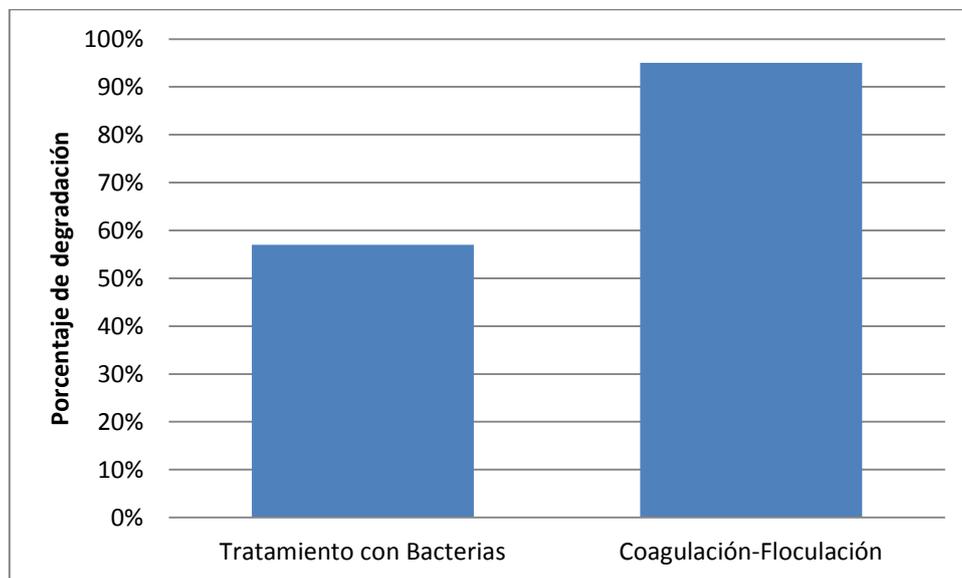


Figura 39. Porcentaje de variación de sólidos sedimentables

5.6.2 Sólidos Suspendidos

Al inicio, el agua residual presenta sólidos suspendidos (flotabilidad de materia orgánica) de 0,3 mg/L por la presencia de sal (Dan, 2001, p 15). Al agregar los microorganismos para la biorremediación, estos sólidos suspendidos incrementan. Por las características salinas de esta agua, esta biomasa y los sólidos no sedimentan, lo que se refleja en la Figura 24 como el incremento en todas las réplicas. Después del tratamiento mediante coagulación - floculación se generó la precipitación de la mayoría de los sólidos suspendidos, que se observa al final de la misma figura.

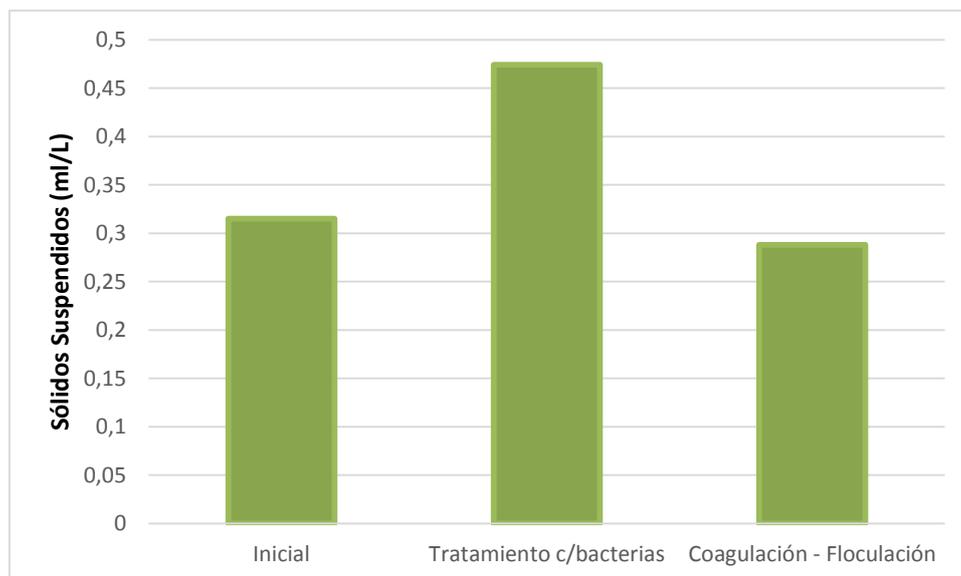


Figura 40. Variación de los sólidos suspendidos durante los tratamientos

Entre el agua residual al inicio del tratamiento y la biorremediación, existe un incremento del 33% de sólidos suspendidos. Mientras que entre el tratamiento biológico y el tratamiento primario mediante coagulación – floculación esta cantidad decrece en 66% en promedio.

5.6.3 Turbidez

Los resultados del parámetro turbidez, al igual que los sólidos suspendidos, registran datos más elevados en la fase en la que se incorporan las bacterias, que en la fase inicial y una disminución al terminar los tratamientos.

El incremento en la segunda parte del tratamiento se debe a las partículas suspendidas en el agua por la presencia del agua residual con sal, que no permite la sedimentación (Lafabvre y Moletta, 2006, p 3679) más las bacterias agregadas. Al final del tratamiento, el agua muestra una reducción importante de turbidez y coloración con respecto a la inicial. Por la acción coagulante del PCA (policloruro de aluminio).

Una vez realizada la prueba de jarras en los diferentes experimentos realizados, se pudo observar a simple vista, y posteriormente con los resultados de los diversos parámetros analizados, la importancia de un tratamiento de coagulación - floculación para este caso.

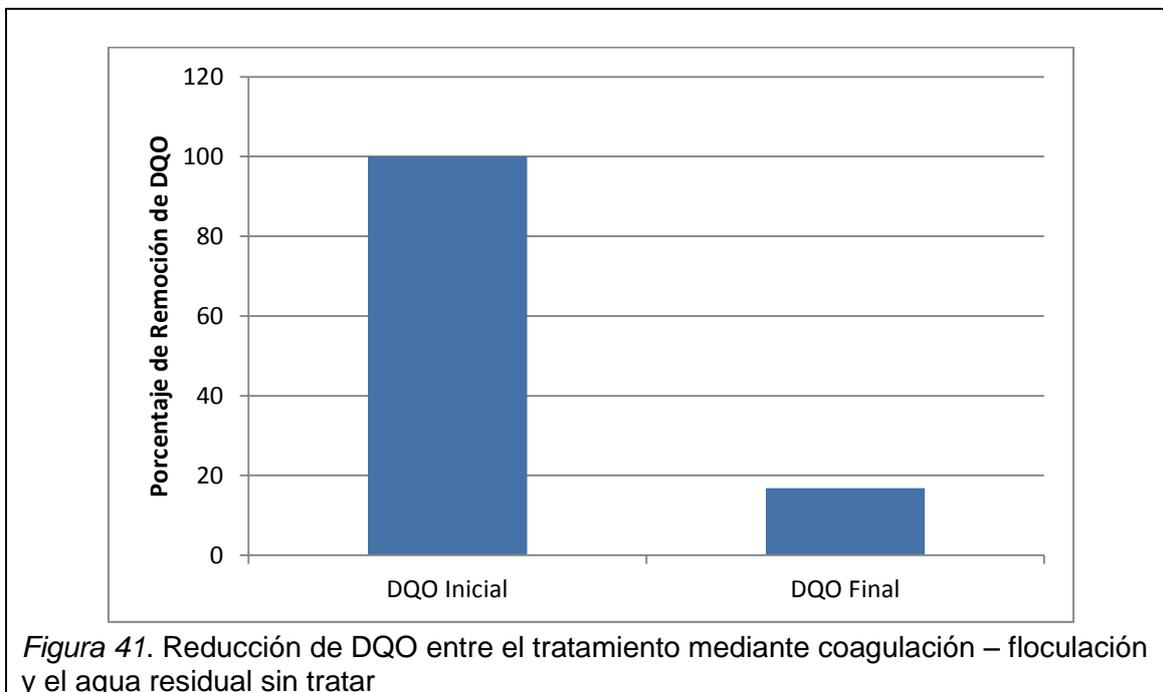
Visto en porcentaje se aprecia que la reducción en la turbidez es de más del 40% en todas las réplicas, esto se divisa a simple vista por el color y la claridad del agua que ingresa al tratamiento con respecto al agua tratada.

5.6.4 Demanda química de oxígeno

Esta sección es referente al cambio en la demanda química de oxígeno (DQO) durante las diferentes etapas del tratamiento del agua residual sintética.

En la Figura 26, del capítulo anterior, se muestra claramente como aumenta la demanda química de oxígeno entre las etapas inicial y tratamiento de biorremediación con microorganismos, en las cuales al agua con alta carga orgánica se le adicionan los microorganismos. El cambio entre la fase de biorremediación y coagulación - floculación del tratamiento es un cambio

mucho más notorio y drástico. Entre el resultado inicial y final existe una reducción de 18 300 mgO₂/l, que en porcentaje es igual al 83,18% de reducción en este parámetro.



Esta remoción de DQO fue similar al 80% logrado por Kargi y Dinçer, utilizando bacterias halófilas aerobias en un reactor secuencial (Biological treatment of saline wastewater by fed-batch operation, 2000).

El agua residual sintética utilizada en el experimento tuvo una alta demanda química de oxígeno, en comparación al agua residual que se espera encontrar en los tipos de industrias que aplican para el caso de estas aguas con elevada salinidad. A pesar de estas condiciones, los microorganismos sobrevivieron en este medio contaminado y demostraron no reducir su actividad en esta situación.

5.7 ANÁLISIS DE LA PROPUESTA ECONÓMICA

En esta sección se realiza un análisis del costo real de la aplicación de este proyecto y los beneficios en el campo económico, ambiental y social que pueden ser generados por el producto de esta investigación.

5.7.1 Costos de inversión

Esta investigación fue realizada en escala de laboratorio, para poder ser aplicada en plantas de tratamiento de aguas residuales que tratan aguas con alta salinidad, por lo que no se toman en cuenta valores relacionados con la planta de tratamiento. En la Tabla 9 se muestra el costo de los compuestos utilizados para crear los medios de cultivo sólidos y líquidos para el crecimiento bacteriano.

Tabla 9. Inversión en materiales de la investigación

Compuesto	Cantidad	Precio (USD.)
Agar nutritivo	500g	85
Medio EC	500g	45
Sulfato de magnesio heptahidratado	500g	35
Extracto de levadura	500g	45
Peptona	500g	47
Cloruro de Calcio (CaCl ₂)	500g	5
Cloruro de Amonio (NH ₄ Cl)	500g	10
Sal de mesa (NaCl)	500g	0,25
Total		272,25

La cantidad de los compuestos se basa en relación a la forma en que estos son vendidos ya que para esta investigación no se utilizaron todas estas cantidades, por lo que el valor que se registra en la tabla es mayor y dura para muchas repeticiones. La mayor parte de estos materiales fueron proporcionados por el laboratorio de Ingeniería Ambiental de la Universidad de las Américas para la realización de este estudio.

Con los compuestos descritos en la Tabla 9, se pueden realizar varios litros de medio de cultivo tanto para el aislamiento de las bacterias como para su posterior crecimiento y para el uso en la biorremediación.

Además, se utilizaron bombas para oxigenar el agua en el tratamiento, y se realizaron análisis fuera del laboratorio.

Tabla 10. Otros costos de la investigación

Material	Cantidad	Precio (\$)
Bomba de aireación	3	18
Análisis DQO	1	30
Total		84

El análisis de la DQO fue realizado en un laboratorio externo, mientras los demás fueron analizados con el equipo disponible en el Laboratorio de la Universidad de las Américas.

5.7.2 Costo de operación y mantenimiento

Al estar planeado como un proceso dentro del tratamiento de aguas de las empresas, tanto la operación como el mantenimiento son los mismos que se manejaban antes de la inclusión de las bacterias halófilas. Fuera de la planta de tratamiento, se debe mantener a las bacterias siempre en incubación a una temperatura de 37 °C y cambiando a medio fresco cada semana.

5.7.3 Beneficios para el sistema actual

5.7.3.1 Tiempo de retención en la planta de tratamiento

Al introducir bacterias adaptadas a la salinidad y en periodo de crecimiento exponencial al tratamiento de aguas, se reduce el tiempo en el que estas

empiezan a degradar los contaminantes presentes, en lugar de que empiecen a crecer al iniciar el tratamiento.

5.7.3.2 Cuerpos receptores de agua

Con la implementación de este estudio en el tratamiento de aguas residuales en las empresas, se pretende que el agua descargada hacia los cuerpos receptores de agua cumpla con las normas establecidas por la ley, evitando sanciones y preservando las condiciones del medio.

CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 CONCLUSIONES

Los objetivos planteados en el objetivo general y objetivos específicos fueron cumplidos con resultados satisfactorios, gracias al diseño y funcionamiento del tratamiento de biorremediación.

- Se definió un aislamiento adecuado de bacterias y un medio que brinde mejor crecimiento. El medio que correspondió a la fórmula 5.
- Se realizó un plan de muestreo en base a mapas georreferenciados que ayudan a tener una idea gráfica de las características del tipo de agua y microorganismos que existen en los puntos exactos en donde se tomaron las muestras.
- Los componentes cloruro de sodio y sulfato de magnesio fueron los componentes más significativos para el mejor crecimiento bacteriano, por lo que se deben utilizar en los niveles que dan el mejor resultado: cloruro en nivel bajo (2,5%) y sulfato en nivel alto (0,9g).
- Las cepas bacterianas de las muestras tomadas en: Leónidas Plaza Gutiérrez, San Vicente y Pedernales, presentaron degradación de proteínas en el medio, por lo que fueron usadas para la biorremediación.
- Las cepas bacterianas de la muestra tomada en Canoa, no mostraron una degradación en el medio con proteínas y crecieron en menor cantidad en comparación con las otras muestras, por lo que no fueron incluidas en el proceso de biorremediación.
- La muestra tomada en Pedernales presentó el mayor crecimiento entre todos los puntos. En este punto se encontraba una pequeña comunidad a orillas del punto de muestreo, esto presumiblemente se debe a la adaptación a la salinidad de coliformes fecales.

- La sedimentación fue el principal problema presentado en el experimento de remediación de aguas residuales con alta salinidad, y solo pudo ser corregido mediante el tratamiento mediante coagulación floculación.
- Los parámetros analizados en el estudio arrojaron resultados positivos en cuanto al mejoramiento de la calidad del agua entre el agua residual sintética antes y después del tratamiento.
- Se demostró resultados de degradación en agua residual sintética con una carga mucho mayor a la que se puede encontrar en condiciones reales.

6.2 RECOMENDACIONES

- Utilizar los diferentes tratamientos con bacterias halófilas aerobias mostrados en el capítulo 2 puede ayudar a comparar los grados de sedimentación entre ellos y demostrar si existe un tratamiento que evite el uso de coagulantes y floculantes.
- La creación de aguas residuales sintéticas que reproduzcan las características del agua residual de otras empresas que contienen alta salinidad, será una gran ayuda para saber las características degradadoras de estas bacterias.
- Debido a que se demostró que los compuestos más importantes fueron el cloruro de sodio y el sulfato de magnesio, se deben utilizar en los niveles indicados para obtener los mejores resultados.
- Utilizar agua residual de una empresa pesquera servirá para observar el efecto de los microorganismos en condiciones reales.

- Tomar muestras de agua de diferentes locaciones de la costa y aumentar los datos en los mapas georreferenciados.
- Realizar las pruebas de actividad proteolítica con muestras nuevas para garantizar que existirán resultados en la degradación.
- Se recomienda realizar una caracterización de microorganismos mediante técnicas moleculares para conocer los microorganismos halófilos presentes en el agua natural salina.

REFERENCIAS

- Afonso, M., & Bórquez, R. (2002). Review of the treatment of seafood processing wastewaters and recovery of proteins therein by membrane separation processes — prospects of the ultrafiltration of wastewaters from the fish meal industry. Elsevier , 29-45.
- Aguinaga, S. (1996). MANUAL DE PROCEDIMIENTOS ANALITICOS PARA AGUAS Y EFLUENTES. Laboratorio de DINAMA.
- Armenante, P. (1999). New Jersey Institute of Technology. Obtenido de <http://cpe.njit.edu/dlnotes/che685/cls07-1.pdf>
- Ates, Ö., Oner, E. T., Arıkan, B., Denizci, A. A., & Kazan, D. (2007). Isolation and identification of alkaline protease producer halotolerant *Bacillus licheniformis* strain BA17. *Annals of Microbiology* , 369-375.
- Bratby, J. (2006). Coagulation and Flocculation in Water and Wastewater Treatment. Londres: IWA.
- Brown, H., & Gibbons, N. (1955). THE EFFECT OF MAGNESIUM, POTASSIUM, AND IRON ON THE GROWTH AND MORPHOLOGY OF RED HALOPHILIG BACTERIA. *Canadian Journal of Microbiology* , 486-494,.
- Casas, O., Elías, S., Casas, F., & López, J. (2008). La evaporación al vacío, una tecnología para la reducción de residuos y reutilización del agua. *Tecnología del agua* , 56-63.
- Castillo, P., Bezanilla, J., Amieva, J., Jácome, A., & Tejedor, I. (1995). Depuración de agua residual con salinidad variable empleando un proceso de biodiscos (RBC). *Ingeniería del Agua* , 25.
- Dan, N. (2001). BIOLOGICAL TREATMENT OF HIGH SALINITY WASTEWATER USING YEAST AND BACTERIAL SYSTEMS. Bangkok.

- De Dios, A. (2007). Aplicación del Diseño de Experimentos en el proceso de tintura del poliéster. Cholula: Universidad De Las Américas.
- Diario, E. (3 de Marzo de 2013). Atún: Exportaciones y capturas en alza. El Diario .
- Diario, E. (Domingo de septiembre de 2011). Malos olores afectan a decenas de familias. El Diario , pág. 1.
- Durai, G., & Rajasimman, m. (2011). Biological treatment of tannery wastewater - A review. *Journal of Environmental Science and Technology* , 1-13.
- García, J. (2007). Síntesis de ceramicos tecnológicos mediante métodos de combustión de geles de acrilamida. Barcelona: Universitat de Barcelona.
- Gonzalez-Hernandez, J., & Peña, A. (2002). Estrategias de adaptación de microorganismos halófilos y *Debaryomyces hansenii* (Levadura halófila). *Revista Latinoamericana de Microbiología* , 137-156.
- Guerra, K., Dahm, K., & Dunder, S. (septiembre de 2011). Oil and Gas Produced Water Management and Beneficial Use in the Western United States. Obtenido de Bureau of Reclamation: <http://www.usbr.gov/research/AWT/reportpdfs/report157.pdf>
- Gutiérrez, H., & De la Vara, R. (2008). Análisis y diseño de experimentos. México: McGraw-Hill.
- Kapdan, I., & Erten, B. (2006). Anaerobic treatment of saline wastewater by *Halanaerobium lacusrosei*. *Elsevier* , 449-453.
- Kargi, F. (2002). Enhanced biological treatment of saline wastewater by using halophilic bacteria. *Biotechnology Letters* , 1569-1572.
- Kargi, F., & Dincer, A. (2000). Biological treatment of saline wastewater by fed-batch operation. *Water Environment Research* , 170-174.

- Kunte, H., Trüper, H., & Stan-Lotter, H. (s.f.). Halophilic Microorganisms. Recuperado el 25 de 01 de 2014, de DLR: http://www.dlr.de/me/Portaldata/25/Resources/dokumente/publikationen/P2_12.pdf
- Lafabvre, O., & Moletta, R. (2006). Treatment of organic pollution in industrial saline wastewater: A literature review. *Science Direct* , 3873.
- Madigan, M., Martinko, J., & Parker, J. (2004). *Biología de los microorganismos*. Madrid: Pearson.
- Medina, I. (2007). *Tratamiento de aguas de producción con electrodiálisis*. Mérida: Universidad de los Andes.
- Moon, B.-H., Heo, J.-S., & Choi, H.-S. (1997). Treatment of Wastewater by the Activated Sludge with Nonwoven Fabric Separation. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* , 136-140.
- Narváez, V. (2007). *Aislamiento e identificación de bacterias aerobias halófilas con actividad proteolítica procedentes de piscinas de la industria de sal ECUASAL localizada en Santa Elena - Ecuador*. Carrera de Ingeniería en Biotecnología. Sangolquí: ESPE.
- Plackett, R., & Burman, P. (1946). The Design of Optimal Multifactorial Experiments. *Biometrika* , 305-325.
- Ramirez, N., Sandoval, H., & Serrano, J. (2004). Las bacterias halófilas y sus aplicaciones biotecnológicas. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* , 12-23.
- Rittmann, B., & McCarty, P. (2001). *Biotecnología del medio ambiente*. Madrid: Mc Graw Hill.
- Rodríguez, J. F. (1995). *Eliminación de metales alcalinos de polioles mediante intercambio iónico*. Cuenca: Universidad de Castilla-La Mancha.

- Sawyer, C., McCarthy, P., & Parkin, G. (2003). *chemistry for environmental engineering and science*. New York: McGraw Hill.
- Sullivan, J., Bowman, R., Katz, L., & Kerry, K. (2004). *WATER TREATMENT TECHNOLOGY FOR OIL AND GAS PRODUCED WATER*. Identifying Technologies to Improve Regional Water Stewardship: North-Middle Rio Grande Corridor . Austin.
- Tejedor, C. (2011). Biorremediación. Obtenido de Universidad de Alcalá: http://www2.uah.es/tejedor_bio/bioquimica_ambiental/biorremediacion.pdf
- Umaña, R. (2004). Tratamiento de aguas residuales de la industria de curtiembre mediante un sistema de lodos activos a escala piloto. Temuco: Universidad de la Frontera.
- Vidali, M. (2001). Bioremediation. An overview. 8th International Chemistry Conference in Africa (págs. 1163–1172). Dakar: IUPAC.
- Villanueva, J. (domingo 24 de febrero de 2013). Récord en exportaciones pesqueras. El Comercio .
- Ziegler, A. (2002). *ISSUES RELATED TO USE OF TURBIDITY MEASUREMENTS AS A SURROGATE FOR SUSPENDED SEDIMENT*. Turbidity and Other Sediment Surrogates Workshop, (pág. 3). Reno.

ANEXOS

ANEXO 1

RESULTADOS DE CARACTERIZACIÓN

Laboratorio de la Universidad de las Américas

Tabla del Conteo Microbiano

	A	B	C	D	E	F	G	Conteo (UFC/ml)		
								R1	R2	R3
1	+	-	+	-	-	-	+	500 000	600 000	30 000
2	+	+	-	+	-	-	-	30 000	400 000	200 000
3	-	+	+	-	+	-	-	10 000	0	60 000
4	+	-	+	+	-	+	-	10 000	0	0
5	+	+	-	+	+	-	+	200 000	500 000	500 000
6	+	+	+	-	+	+	-	3 000	3 000	4 000
7	-	+	+	+	-	+	+	2 000	1 000	4 000
8	-	-	+	+	+	-	+	3 000	3 000	2 000
9	-	-	-	+	+	+	-	2 000	0	6 000
10	+	-	-	-	+	+	+	1 000	2 000	2 000
11	-	+	-	-	-	+	+	0	0	0
12	-	-	-	-	-	-	-	28 000	25 000	70 000

Tabla de resultados de sólidos sedimentables

Replica	Sólidos Sedimentables (ml/l)		
	Inicial	Tratamiento c/bacterias	Coagulación - Floculación
1	6	14	250
2	4	11	200
3	6	12	250

Tabla de resultados de sólidos suspendidos

Replica	Sólidos Suspendidos		
	Inicial	Tratamiento c/bacterias	Coagulación - Floculación
1	0,322	0,486	0,295
2	0,299	0,446	0,262
3	0,315	0,474	0,288

Tabla de mediciones de Turbidez

Replica	Turbidez (NTU)		
	Inicial	Tratamiento c/bacterias	Coagulación – Floculación
1	160	893	81,5
2	156,6	855,6	80
3	165,3	982	203,1

ANEXO 2

RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE DQO LABORATORIO

TRAHISA					
ANÁLISIS Y TRATAMIENTO DE AGUAS					
ANÁLISIS DE AGUAS RESIDUALES					
NUMERO DE LA MUESTRA		34	35	36	
ORIGEN / FUENTE		M1	M2	M3	
FECHA DE RECOLECCION		2013-12-12	2013-12-12	2013-12-12	
HORA DE RECOLECCION					
FECHA DE ANALISIS		2013-12-17	2013-12-17	2013-12-17	
ANÁLISIS FISICOS Y QUIMICOS	UNIDADES	CONCENTRACIONES			
TEMPERATURA	°C				
pH	Unidades				
CONDUCTIVIDAD	µmhos/cm				
TURBEDAD	U.N.T.				
COLOR	Pt-Co				
SOLIDOS DISUELTOS TOTALES	mg/l				
SOLIDOS TOTALES	mg/l				
SOLIDOS SUSPENDIDOS TOTALES	mg/l				
SOLIDOS SUSPENDIDOS VOLATILES	mg/l				
SOLIDOS SUSPENDIDOS FIJOS	mg/l				
SOLIDOS SEDIMENTABLES	ml				
OXIGENO DISUELTO	mg/l				
DISO ₂	mg/l				
DQO	mg/l	22000.00	24200.00	3700.00	
DUREZA TOTAL	mg/l CaCO ₃				
DUREZA CALCICA	mg/l CaCO ₃				
AMONIAO	mg/l				
FOSFATOS	mg/l				
HIERRO TOTAL	mg/l				
MANGANESO	mg/l				
NITRITOS	mg/l				
NITRATOS	mg/l				
NITROGENO INORGANICO	mg/l				
NITROGENO TOTAL	mg/l				
GRASAS Y ACEITES	mg/l				
FENOLAS	mg/l				
CLORO RESIDUAL TOTAL	mg/l				
DETERGENTES	mg/l				
ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO	UNIDADES				
COLIFORMES TOTALES	NMP/100 ml				
COLIFORMES FECALES	NMP/100 ml				
OBSERVACIONES:		PROYECTO: TESIS DE GRADO			
		FUENTE: M1.- MUESTRA SINTETICA M2.- MUESTRA SINTETICA CON BACTERIAS. M3.- MUESTRA TRATADA			
		Cantón: QUITO			
		Provincia: PICHINCHA			
		Solicitado por: TOMAS VILLOTA			
REALIZADO POR:		