

**BIODEGRADACIÓN DE LA MATERIA ORGÁNICA PRESENTE EN LAS
AGUAS RESIDUALES DE UNA EMPRESA DE PINTURAS**

LUISA FERNANDA POSADA URIBE

SANDRA MOSQUERA LÓPEZ

UNIVERSIDAD EAFIT

ESCUELA DE INGENIERÍA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA DE PROCESOS

MEDELLÍN

2007.

**BIODEGRADACIÓN DE LA MATERIA ORGÁNICA PRESENTE EN LAS
AGUAS RESIDUALES DE UNA EMPRESA DE PINTURAS**

LUISA FERNANDA POSADA URIBE

SANDRA MOSQUERA LÓPEZ

**Proyecto de grado para optar al título de
Ingeniero de Procesos**

**Asesora: MRes. Valeska Villegas
Ingeniera Química MRes. Biotecnología Vegetal
Universidad EAFIT**

UNIVERSIDAD EAFIT

**ESCUELA DE INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA DE PROCESOS
MEDELLÍN
2007.**

**La frase mas excitante que se puede oír en ciencia, la que anuncia
nuevos descubrimientos, no es "(Eureka!" ((Lo encontré!) sino, 'Es
Extraño ...'.**

(Isaac Asimov)

A nuestras familias, a nuestros amigos y compañeros, que durante estos años de estudio y dedicación aportaron vehementemente en la construcción de las mujeres profesionales que hoy somos.

AGRADECIMIENTOS

VALESKA VILLEGAS ESCOBAR, por hacer posible este proyecto, por su incondicional apoyo desde nuestros inicios con la tesis hasta la entrega, por ser nuestra guía en el mundo de la biotecnología y por estar siempre atenta a todas nuestras necesidades.

CARLOS MANUEL PAREJA CADAVID, Gerente Manufactura CGP, por su disposición, colaboración e impulso al proyecto.

JHON JAIRO ARTEAGA TORO, Gerente Planta Pintura en Polvo CGP, por su colaboración en el proyecto.

SERGIO IVÁN URIBE LÓPEZ, Ingeniero de CGP, por todo su apoyo y disposición frente a las necesidades del proyecto.

JUAN MANUEL SANTAMARÍA, Ingeniero Planta Base Agua. Por su constante ayuda e incondicional apoyo.

SIGILFREDO CÁRDENAS, auxiliar de laboratorio de Biotecnología. Por toda la ayuda prestada en el laboratorio de Biotecnología y por su apoyo incondicional en el proyecto.

EDGAR DARIO ARBELÁEZ, Coordinador de los laboratorios de Ingeniería de Procesos de la Universidad EAFIT; por su colaboración con la ejecución del proyecto.

AUXILIARES DE LABORATORIO Universidad EAFIT, JHON JAIRO ESTRADA BUSTAMANTE y MAURICIO LONDOÑO RESTREPO por su ayuda en la solución de inconvenientes.

Nota de aceptación:

Firma del presidente del jurado

Firma del jurado

Firma del jurado

Medellín, 11 de octubre de 2007

TABLA DE CONTENIDO

<u>RESUMEN</u>	XVI
<u>ABSTRACT</u>	XVIII
<u>INTRODUCCIÓN</u>	XIX
<u>1. OBJETIVOS</u>	21
<u>1.1 OBJETIVO GENERAL</u>	21
<u>1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</u>	21
<u>2. MARCO TEÓRICO</u>	3
<u>2.1 CONSTITUYENTES DE LAS AGUAS RESIDUALES</u>	3
<u>2.1.1 Constituyentes físicos</u>	4
<u>2.1.2 Constituyentes químicos inorgánicas</u>	6
<u>2.1.3 Constituyentes orgánicos:</u>	7
<u>2.2 RELACIONES ENTRE DBO Y DQO</u>	11
<u>2.3 CALIDAD DEL AGUA</u>	11
<u>2.4 NORMATIVIDAD</u>	12
<u>2.5 TRATAMIENTOS BIOLÓGICOS PARA AGUAS RESIDUALES</u>	14
<u>2.5.1 Land farming:</u>	14
<u>2.5.2 Compostaje:</u>	14
<u>2.5.3 Procesos de Biorreactores:</u>	14
<u>2.5.4 Bioventing:</u>	14

<u>2.5.5 Biofiltros:</u>	14
<u>2.5.6 Bioestimulación:</u>	14
<u>2.5.7 Biorremediación intrínseca:</u>	14
<u>2.5.8 Bombeo y tratamiento:</u>	15
<u>2.6 BIODEGRADACIÓN Y BIORREMEDIACIÓN</u>	15
<u>2.7 BACTERIAS, LOS MICROORGANISMOS MÁS IMPORTANTES EN PROCESOS BIORREMEDIATIVOS</u>	17
<u>2.8 ADAPTACIÓN MICROBIANA</u>	20
<u>2.9 CINÉTICA Y CRECIMIENTO BACTERIANO</u>	21
<u>2.10 ANTECEDENTES DE TRATAMIENTO BIOLÓGICO CON BACTERIAS</u>	22
<u>3. METODOLOGÍA</u>	27
<u>3.1 MATERIALES Y EQUIPOS</u>	28
<u>3.1.1. Reactivos</u>	28
<u>3.1.2. Equipos</u>	28
<u>3.2 UBICACIÓN</u>	29
<u>3.3 AGUA RESIDUAL</u>	29
<u>3.4 MICROORGANISMOS</u>	30
<u>3. 5 ENSAYOS PRELIMINARES PARA EL AGUA RESIDUAL</u>	30
<u>3.5.1 pH (buffers):</u>	30
<u>3.5.2 Esterilización del agua:</u>	31
<u>3.5.2.1 Esterilización con radiación U.V.:</u>	31
<u>3.5.2.2 Esterilización por filtración:</u>	31
<u>3.6 MEDIOS DE CULTIVO</u>	32
<u>3.7 PROCESO DE AISLAMIENTO DE LAS CEPAS NATIVAS</u>	33
<u>3.7.1 Método de dilución seriada:</u>	34
<u>3.7.2 Cultivo en medios selectivos:</u>	34
<u>3.8 CONSERVACIÓN DE LAS CEPAS AISLADAS</u>	35
<u>3.9 TÉCNICAS DE ANÁLITICAS</u>	35
<u>3.9.1 Medición de biomasa:</u>	35
<u>3.9.2 Caracterización del agua residual:</u>	37
<u>3.10.1 Preparación de los preinóculos:</u>	38

<u>3.10.2 Selección de cepas microbianas:</u>	38
<u>3.10.3 Adaptación de las cepas microbianas:</u>	39
<u>3.11 DETERMINACIÓN DE INHIBICIÓN ENTRE CEPAS</u>	42
<u>3.12 CINÉTICAS DE CRECIMIENTO Y DEGRADACION CON CONSORCIOS MICROBIANOS</u>	43
<u>3.12.1 Consorcio comercial:</u>	43
<u>3.12.2 Consorcio nativo:</u>	44
<u>3.12.3. Diseño de experimentos y análisis estadísticos para la determinación del mejor tratamiento (tratamiento con consorcio nativo, consorcio comercial o cepa individual):</u>	44
<u>3.13 DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS</u>	45
<u>3.13.1 Determinación de la velocidad específica de crecimiento:</u>	45
<u>3.14 ELABORACIÓN DE EVALUACIÓN ECONÓMICA DEL TRATAMIENTO BIOLÓGICO Y EL PROCESO ACTUAL.</u>	46
<u>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	47
<u>4.1 ENSAYOS PRELIMINARES DEL AGUA RESIDUAL</u>	47
<u>4.1.1 Ensayo de pH (buffers):</u>	47
<u>4.1.2. Esterilización del agua residual</u>	48
<u>4.2 AISLAMIENTO DE CEPAS MICROBIANAS</u>	51
<u>4.3 CURVAS DE CRECIMIENTO</u>	55
<u>4.4 SELECCIÓN DE CEPAS MICROBIANAS</u>	55
<u>4.4.1 Análisis de la formación de biomasa y velocidad específica de crecimiento en los ensayos preliminares de selección de cepas:</u>	56
<u>4.4.2 Análisis de la reducción de DQO en los ensayos preliminares de selección de cepas:</u>	59
<u>4.5 ADAPTACIONES DE LAS CEPAS</u>	61
<u>4.5.1 Análisis de biomasa para las cepas en las adaptaciones:</u>	61
<u>4.5.2 Análisis de la velocidad específica máxima de crecimiento para las cepas en las adaptaciones:</u>	67
<u>4.5.3 Resultados DQO:</u>	71
<u>4.6 INHIBICIÓN ENTRE CEPAS MICROBIANAS</u>	76
<u>4.7 RESULTADOS DE LOS TRATAMIENTOS CON CONSORCIOS</u>	78
<u>4.7.1 Análisis de biomasa para los consorcios y la cepa 7:</u>	79
<u>4.7.2 Análisis de la velocidad específica máxima de crecimiento:</u>	81
<u>4.7.3 Análisis de la reducción de la DQO:</u>	83
<u>4.7.4 Cinéticas de degradación de DQO:</u>	85

<u>5. EVALUACIÓN ECONÓMICA TRATAMIENTO BIOLÓGICO</u>	89
<u>5.1 REQUERIMIENTOS DEL PROCESO</u>	89
<u>5.1.1 Materias Primas:</u>	89
<u>5.1.2 Equipos requeridos:</u>	89
<u>5.1.3 Inversiones Fijas:</u>	90
<u>5.1.4 Inversiones diferidas:</u>	91
<u>5.1.5 Capital de trabajo:</u>	91
<u>5.1.6 Gastos preoperativos</u>	92
<u>5.1.7 Costos</u>	92
<u>5.1.8 Ingresos</u>	93
<u>5.1.9 Flujo de efectivo</u>	93
<u>5.2 ANÁLISIS DE RENTABILIDAD</u>	93
<u>5.2.1 Valor presente neto</u>	93
<u>5.2.2 Tasa Interna de Retorno</u>	94
<u>5.2.3 Relación Beneficio/Costo</u>	94
<u>6. EVALUACIÓN ECONÓMICA DE LA SITUACIÓN ACTUAL</u>	94
<u>6.1 REQUERIMIENTOS DEL PROCESO</u>	94
<u>6.1.1 Materias Primas</u>	94
<u>6.1.2 Capital de trabajo</u>	95
<u>6.1.3 Costos</u>	95
<u>6.1.4 Ingresos</u>	96
<u>6.1.5 Flujo de efectivo de la situación actual</u>	96
<u>6.2 ANÁLISIS DE RENTABILIDAD</u>	96
<u>6.2.1 Valor presente neto</u>	96
<u>6.2.2 Tasa Interna de Retorno</u>	96
<u>6.2.3 Relación Beneficio/Costo</u>	96
<u>7. PROCESOS COMPLEMENTARIOS AL PROCESO PARA REDUCIR LA CARGA ORGÁNICA Y LOGRAR AGUAS PARA REPROCESO</u>	99
<u>8. CONCLUSIONES</u>	97
<u>9. RECOMENDACIONES</u>	99
<u>10. BIBLIOGRAFÍA</u>	I

11. CIBERGRAFÍA

VIII

ANEXOS

IX

LISTA DE TABLAS

<u>Tabla 1. Tipos De Bacterias Según La Temperatura Del Medio</u>	19
<u>Tabla 2. Agar Nutritivo</u>	32
<u>Tabla 3. Agar Cetymide</u>	32

<u>Tabla 4. Agar Ogy (Agar Oxitetraciclina-Glucosa-Extracto De Levadura)</u>	32
<u>Tabla 5. Agar Sabouraud</u>	32
<u>Tabla 6. Caldo Nutritivo</u>	33
<u>Tabla 7. Tratamientos De Adaptación.</u>	39
<u>Tabla 8. Composición Del Consorcio Comercial Bacthons[®] Sc</u>	43
<u>Tabla 9. Comportamiento De Las Aguas En Los Buffers Para Cambio De Ph.</u> 47	
<u>Tabla 10. Ensayos De Esterilización Efectuados Y Sus Resultados.</u>	49
<u>Tabla 11. Resultados De Seguimiento Para El Aislamiento*</u>	51
<u>Tabla 12. Cepas Aisladas En El Proceso.</u>	52
<u>Tabla 13. Crecimiento De Las Cepas En Los Agares Selectivos</u>	53
<u>Tabla 14. Resultado Tinción De Gram</u>	54
<u>Tabla 15. Ecuaciones Y Correlaciones De Las Curvas De Crecimiento De Las Cepas Y Consorcio Comercial Bacthon Sc.</u>	55
<u>Tabla 16. Linealizaciones Para Relaciones Reducción De La Dqo Vs. Densidad Óptica.</u>	72
<u>Tabla 17. Resultados De Inhibición Entre Cepas*.</u>	76
<u>Tabla 18. Reducción De Dqo En Los Procesos De Tratamiento De Aguas Residuales</u>	87
<u>Tabla 19. Equipos Requeridos Para Tratamiento Biológico De Efluentes.</u>	89

<u>Tabla 20. Inversiones Diferidas Para El Proyecto Con Tratamiento Biológico</u>	90
<u>Tabla 21. Capital De Trabajo Para El Proyecto</u>	90
<u>Tabla 22. Costos De Operación Para El Tratamiento Biológico</u>	91
<u>Tabla 23. Ingresos Del Proyecto</u>	92
<u>Tabla 24. Capital De Trabajo Para La Situación Actual</u>	94
<u>Tabla 25. Costos Del Proceso Como Se Realiza Actualmente</u>	94

LISTA DE FIGURAS

<u>Fig. 1 Tipos De Degradación De Contaminantes Por Tratamiento Biológico</u>	16
<u>Fig. 2 Formas De Las Bacterias</u>	18

<u>Fig. 3 Tamaño De Los Microorganismos</u>	48
<u>Fig. 4 Halos De Inhibición Presentados En El Ensayo Entre Cepa 1 En Plateo Y Cepa 7 En Papel Filtro.</u>	76
Fig. 5 Flujo de efectivo para el tratamiento biológico	91
Fig. 6 Flujo de efectivo para el proceso como se realiza actualmente	92
Fig. 7 Proceso #1 propuesto para el tratamiento de Aguas residuales de la planta base agua de CGP	95
Fig. 8 Proceso #2 propuesto para el tratamiento de Aguas residuales de la planta base agua de CGP	96

LISTA DE GRÁFICAS

<u>Gráfica 1. Cinética De Crecimiento De Las Cepas Aisladas Del Agua Residual</u>	56
---	----

<u>Gráfica 2. Velocidades Específicas De Crecimiento Y Densidad Óptica A Las 22 Horas Para Las Cepas Aisladas Del Agua Residual.</u>	57
--	----

<u>Grafica 3. Reducción Porcentual De La Dqo Y Densidad Óptica A Las 22 Horas Para Las Cepas Aisladas Del Agua Residual.</u>	59
<u>Grafica 4. Adaptación Cepa 1</u>	61
<u>Gráfica 5. Adaptación Cepa 3</u>	61
<u>Gráfica 6. Adaptación Cepa 4.</u>	61
<u>Gráfica 7. Adaptación Cepa 7.</u>	62
<u>Gráfica 8. Interacciones De La Variable Dependiente Densidad Óptica Con Los Factores Cepas Y Concentración De Cn</u>	63
<u>Gráfica 9. Interacción De La Variable Dependiente Do Con Los Factores Cepas Y Tratamiento De Adaptación</u>	65
<u>Grafica 10. Interacciones De La Variable Dependiente Velocidad Específica De Crecimiento (μ_{Xmax}) Con Los Factores Concentración De Cn Y Cepas</u>	66
<u>Gráfica 11. Velocidades Específicas Máximas De Crecimiento Para Las Cepas Adaptadas Y Sin Adaptar</u>	68
<u>Gráfica 12. Interacciones De La Variable Dependiente Reducción De Dqo Con Los Factores Concentración De Cn Y Cepas Adaptadas</u>	70
<u>Gráfica 13. Linealización Reducción Dqo Vs. Densidad Óptica Para La Cepa 1.</u>	72
<u>Gráfica 14. Interacciones De La Variable Dependiente Reducción De Dqo Con Los Factores Cepas Y Proceso De Adaptación</u>	74
<u>Gráfica 15. Cinéticas De Crecimiento Para Los Consorcios Y La Cepa 7.</u>	78
<u>Gráfica 16. Evaluación De Los Consorcios Con Variable Dependiente Densidad Óptica.</u>	80

<u>Gráfica 17. Velocidades Específicas Máximas De Crecimiento Para Los Consorcios.</u>	80
<u>Gráfica 18. Porcentaje De Reducción De Dqo Para Los Consorcios Y Cepa 7.</u>	82
<u>Gráfica 19. Cinética De Crecimiento De Degradación Para El Consorcio 1-4.</u>	84
<u>Gráfica 20. Cinética De Crecimiento De Degradación Para La Cepa 7</u>	85
<u>Gráfica 21. Cinética De Crecimiento Y De Degradación Para El Consorcio Comercial.</u>	85

LISTA DE ANEXOS

<u>Anexo I. Ficha Técnica Y Hojas De Seguridad Polímeros Para Flocculación.</u>	IX
---	----

<u>Anexo Ii. Caracterización De Agua Residual De La Planta Base Agua De Compañía Global De Pinturas.</u>	XIV
<u>Anexo Iii. Decreto 1594 De 1984 (Normatividad De Efluentes)</u>	XV
<u>Anexo Iv. Protocolo De Tinción De Gram.</u>	XVIII
<u>Anexo V. Análisis Estadístico Por Statgraphics 5.1 Para Los Ensayos Preliminares Con 1 G/L De Caldo Nutritivo.</u>	XX
<u>Anexo Vi. Análisis Estadístico Por Statgraphics 5.1 Para El Proceso Con Adaptación</u>	XXIII
<u>Anexo Vii. Análisis Estadístico Por Statgraphics 5.1 Para El Proceso Con Consorcios.</u>	XXXI
<u>Anexo Viii. Linealización Reducción Dqo Vs. Densidad Óptica Para Las Cepa 3, 4 Y 7.</u>	XXXIV
<u>Anexo Xi. Fotografías</u>	XXXV

LISTA DE ECUACIONES

Ecuación 1. Cálculo de la absorbancia	6
Ecuación 2. Absorbancia con relación a la Transmitancia.	6

Ecuación 3. Oxidación	9
Ecuación 4. Síntesis	9
Ecuación 5. Respiración endógena	10
Ecuación 6. Cálculo de biomasa por peso seco.	34
Ecuación 7. Cálculo de la DQO	35
Ecuación 8. Cálculo de la concentración de FAS.	35
Ecuación 9. Ley de Beer	37
Ecuación 10. Cálculo de biomasa por modelo exponencial	42
Ecuación 11. Linealización del modelo exponencial	43

RESUMEN

Debido a la necesidad de la Compañía Global de Pinturas (CGP) por darle un valor agregado a las aguas efluentes del Proceso de Producción de Pinturas Base Agua, se desarrolló un proyecto para el tratamiento biológico de estas con cepas nativas o consorcios, que permita disminuir su la carga orgánica y darles un posible uso en otros procesos de la planta o en el mismo proceso productivo. El tratamiento biológico realizado se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad EAFIT obteniendo las cepas nativas aisladas de los efluentes.

En el proceso de aislamiento se obtuvieron siete (7) cepas de las cuales cuatro (4) fueron viables para el trabajo y se nombraron como cepa 1, 3, 4 y 7. Se sembraron en medio sólido para su conservación y se llevaron a medio líquido para el trabajo de biodegradación de la carga orgánica presente en los efluentes. Se utilizaron dos métodos para transferir las colonias a medio líquido y lograr su crecimiento: procesos con y sin adaptación. Además se trabajó con consorcios nativos (compuestos por dos o tres cepas nativas) y un consorcio comercial (Bacthon), y se compararon los resultados del proceso con cepas puras y consorcios.

Se encontró que la cepa pura que crece más rápidamente y en mayor proporción es la cepa 7, las reducciones de DQO que esta cepa logra son muy similares a los trabajos con otras cepas nativas, con un valor máximo fue de 55.92%. Los consorcios nativos presentaron degradaciones máximas de 50% y el consorcio comercial logró degradación máxima de 73.62%.

Se realizó la evaluación económica del proceso del biodegradación y se encontró un VPN de \$581.325,2, una relación B/C de 1.10 y una TIR del 10%. Indicando viabilidad para el tratamiento.

Se proponen una serie de procesos que conforman el proceso general de tratamiento de aguas residuales para la CGP, estos son tratamientos primarios,

secundarios y terciarios los cuales permiten la reducción de sólidos suspendidos y de la carga orgánica en general.

Palabras claves: Biodegradación, efluentes industriales, cepas nativas, consorcios, reducción de DQO.

ABSTRACT

The water effluents of the paint water based plant from Global Paint Company (CGP) were biologically treated with wild microorganisms. This treatment was able to reduce the organic charge and gave a new alternative for using the waste

water in other plant process operations. This process was carry out at the Biotechnology Laboratory of EAFIT University

Seven wild microorganisms were isolated but only four of them showed potential biodegradation. They were conserved in solid medium and cultivated in liquid media for the degradation evaluation. Different processes were studied with adapted and non adapted microorganisms, with native consortiums, and one commercial consortium (Bacthon ®). It was found that the adaptation didn't enhance the biodegradation activity; additionally a reduction of 56%, 50% and 77% was achieved with a gram negative bacterial isolate (B7), a bacterial native consortium (1-4) and the commercial one respectably.

The economic evaluation reported a VPN of \$581.325,2, a B/C relationship of 1:10, and a TIR of 10%, indicating viability of the treatment process developed.

It was proposed two general processes for the overall water purification which includes primary, secondary and tertiary treatments that reduced the organic charge and fulfill the Colombian Decrete1594/1984.

Key words: Biodegradation, industrial effluents, natives strains, consortiums, COD reduction.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, el impacto ambiental generado por la actividad industrial, se ha convertido en una preocupación general que se acentúa día a día con el desarrollo sin precedentes durante el siglo XXI. La contaminación de las fuentes hídricas debido a los vertimientos industriales es un aspecto crítico. Algunos de

estos vertimientos contienen compuestos xenobióticos y/o recalcitrantes que provienen de actividades químicas, cuya degradación natural es difícil debido a que su composición difiere de compuestos orgánicos naturales. La acumulación de estos compuestos xenobióticos hasta niveles considerables, produce el deterioro de las fuentes hídricas y afecta el ecosistema, acarreando consecuencias devastadoras para otras actividades realizadas con los recursos hídricos. Debido a esto, se está incursionando en diferentes tecnologías o métodos que permitan dar solución a esta situación o por lo menos disminuyan el impacto que se presenta.

Uno de los métodos desarrollados en pro de la descontaminación de las aguas es la biodegradación. Este método biológico permite que los microorganismos se alimenten de una manera controlada de los compuestos xenobióticos o recalcitrantes, permitiéndoles consumir contaminantes tanto de los suelos como de los yacimientos de agua. Este método ha sido ampliamente estudiado en el mundo y se puede aplicar a vertimientos en pequeña y mediana escala. Una ventaja de los métodos biológicos es su gran potencial de remoción y degradación de grandes volúmenes de contaminantes a un costo menor comparado con el de muchas otras tecnologías, ofreciendo una alta viabilidad económica y muy buena eficiencia (Pearce *et al.*, 2003).

La Compañía Global de Pinturas (CGP), es una empresa líder en el mercado de pinturas y recubrimientos en Colombia y América Latina. Esta empresa se encarga de la producción de pinturas y recubrimientos de las marcas líderes en el mercado: Graniplas, Terinsa, ICO y Pintuco (marca principal). Sus productos (pinturas y recubrimientos base agua, en polvo y base solvente) se producen con estrictos controles ambientales debido a la participación de la Compañía en el sistema de Responsabilidad Integral, y por tanto, los frentes de contaminación que puedan presentarse tras el proceso productivo deben atacarse rápidamente

para disminuir el impacto ambiental. Es así, como la Compañía busca la reutilización de aguas de proceso y la disminución de carga contaminante de las aguas efluentes, pues, de esta manera se reducen costos, tanto ambientales como de proceso, y se contribuye al cuidado del medio ambiente y por tanto de la población aledaña a la planta.

Con este proyecto la Compañía aporta al desarrollo de proyectos de investigación en alianza Universidad-Empresa. Además tiene en cuenta métodos científicos especializados para el tratamiento de efluentes, lo que la hace más competitiva en procesos ambientales y permite a la zona incursionar en proyectos de alto valor agregado para los procesos productivos.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

- Degradar las sustancias presentes en las aguas residuales de los efluentes de una industria de pinturas base agua por medio de biodegradación, ya sea con una cepa nativa, con un consorcio de cepas

nativas o con un consorcio comercial, a escala de laboratorio, para mejorar la calidad de los vertimientos arrojados a las corrientes de agua y cumplir la norma de vertimiento de agua indicada en el Decreto 1594/1984.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aislar y seleccionar microorganismos nativos con potencial para la degradación de sustancias de aguas residuales de la industria de pinturas, mediante su capacidad de adaptación a medios de cultivo selectivos.
- Adaptar los microorganismos aislados a los contaminantes con el fin de determinar la concentración de inhibición del microorganismo por las sustancias y la velocidad volumétrica de degradación, a partir del monitoreo del crecimiento del microorganismo, la demanda química de oxígeno (DQO) y la demanda biológica de oxígeno (DBO).
- Evaluar la cinética de crecimiento microbiano y la cinética de degradación de las sustancias del agua residual con las cepas adaptadas, con el consorcio nativo y con el consorcio comercial a partir del monitoreo del crecimiento del microorganismo, la demanda química de oxígeno (DQO) y la demanda biológica de oxígeno (DBO) con el fin de determinar los mayores porcentajes de degradación y cumplir con el Decreto 1594/1984.
- Proponer un diagrama de procesos para el tratamiento de aguas residuales del proceso de producción de pintura base agua, involucrando la biodegradación y algunos procesos secundarios que permitan mejorar la calidad de las aguas y lograr un posible reproceso de las mismas.

2. MARCO TEÓRICO

El agua es una sustancia líquida formada por la combinación de dos volúmenes de hidrógeno y un volumen de oxígeno, que constituye el componente más abundante en la superficie terrestre. El agua es un líquido inodoro e insípido, con un color azul cuando se concentra en grandes masas. A la presión atmosférica (760 mmHg), el punto de fusión del agua pura es de 0°C y el punto de ebullición es de 100°C, cristaliza en el sistema hexagonal, llamándose nieve o

hielo según se presente de forma esponjosa o compacta, se expande al congelarse, es decir aumenta de volumen, de ahí que la densidad del hielo sea menor que la del agua y por ello el hielo flota en el agua líquida. El agua alcanza su densidad máxima a una temperatura de 4°C, que es de 1 g/cm³ (Tebutt, 1999). Es la sustancia base de muchas actividades en el planeta.

2.1 CONSTITUYENTES DE LAS AGUAS RESIDUALES

Los constituyentes de las aguas residuales pueden ser clasificados como físicos, químicos y biológicos (Crites y Tchobanoglous, 2000).

2.1.1 Constituyentes físicos

2.1.1.1 Sólidos: Las aguas efluentes de procesos contienen una variedad de sólidos que van desde hilachas hasta materiales coloidales. En la caracterización de las aguas, los materiales gruesos son removidos generalmente antes de analizar los sólidos en la muestra. Los tipos de sólidos de las aguas son: Sólidos totales (ST), Sólidos Volátiles Totales (SVT), Sólidos Suspendidos Totales (SST), Sólidos Disueltos Totales (SDT) y Sólidos Sedimentables (SS) (Crites y Tchobanoglous, 2000).

- Los Sólidos Totales son aquellos remanentes luego que una muestra se evapora o se seca entre 103 y 105°C (Crites y Tchobanoglous, 2000).
- Los Sólidos Volátiles Totales son aquellos que se volatilizan o incineran a una temperatura de 500 ± 50°C (Crites y Tchobanoglous, 2000).

- Los Sólidos Suspendidos Totales son los que se retienen en un filtro de tamaño de poro específico de 40 a 60 μm luego de un secado a una temperatura de 103 - 105°C. (Crites y Tchobanoglous, 2000).
- Los Sólidos Disueltos son aquellos que logran pasar por un filtro de tamaño de poro de 2.0 μm o menor y luego se evaporan y secan a una temperatura de 105°C. Comprenden coloides (tamaño entre 0.001 a 1 μm). (Crites y Tchobanoglous, 2000).
- Los Sólidos Sedimentables son aquellos sólidos suspendidos que se sedimentarán con el tiempo por fuera de la suspensión (Crites y Tchobanoglous, 2000).

2.1.1.2 Turbiedad: Es una medida de las propiedades de dispersión de la luz en las aguas y es un parámetro utilizado para indicar su calidad con relación al material residual en suspensión coloidal. La medición de la turbiedad se hace por comparación entre la intensidad de la luz dispersada en una muestra y la luz dispersada por una suspensión de referencia bajo las mismas condiciones (Standard Methods, 1995). Los resultados de las mediciones de turbiedad se dan en Unidades Nefelométricas de Turbiedad (UNT) (Crites y Tchobanoglous, 2000).

2.1.1.3 Color: En forma cualitativa el color puede ser usado para estimar la condición general del agua residual. Si el color es café claro, el agua residual lleva aproximadamente 6 horas después de su descarga, si el color es gris claro las aguas llevan algún tiempo de descomposición y si el color es negro se cuenta con aguas sépticas que han sufrido descomposición bacteriana anaerobia. El oscurecimiento de las aguas se da con frecuencia debido a la presencia de

sulfuros, en especial de sulfuro ferroso (FeS). La formación de sulfuros ocurre cuando el ácido sulfhídrico, producido por la reducción del sulfato bajo condiciones anaerobias, se combina con metales divalentes que pueden estar en las aguas residuales, como el hierro (Crites y Tchobanoglous, 2000)

2.1.1.4 Transmitancia o Absorbancia: La reflectancia, transmitancia y absorbancia espectral es la medida de la energía radiante o flujo radiante que es reflejado, transmitido o absorbido por un material o una superficie como función de la longitud de onda de dicha energía o flujo. Estas magnitudes se miden por medio de la técnica de la espectrofotometría. (Simet, 2000).

La transmitancia se relaciona con la absorbancia (o absorbencia) A como

Ecuación 1 ó

Ecuación 2

Donde, $T\%$ es el porcentaje de transmitancia, I es la intensidad de la luz con longitud de onda específica, I_0 es la intensidad de luz incidente (antes que entre a la muestra) y T es transmitancia (Crites y Tchobanoglous, 2000).

2.1.1.5 Temperatura: La temperatura del agua residual es por lo general mayor que la temperatura para abastecimiento como consecuencia de la incorporación de agua caliente proveniente del uso doméstico e industrial. Este parámetro es importante porque afecta directamente las reacciones químicas y las velocidades de reacción, la vida acuática y la adecuación del agua para fines benéficos. Es importante considerar este parámetro ya que el oxígeno es menos soluble a mayor temperatura. (Crites y Tchobanoglous, 2000).

La temperatura óptima para el desarrollo de la actividad microbiana está en el rango de 25 - 35°C para microorganismos mesófilos. (Crites y Tchobanoglous, 2000).

2.1.2 Constituyentes químicos inorgánicos

Los constituyentes químicos inorgánicos de interés comprenden nutrientes, constituyentes no metálicos, metales y gases. Entre los nutrientes inorgánicos están el amoníaco libre, nitrógeno orgánico, nitritos, nitratos y fósforo. A las aguas se les puede medir pH, alcalinidad, cloruros, azufre, metales, pruebas que se consideran netamente inorgánicas. El pH es un parámetro importante, y uno de los más relevantes en el proceso experimental (Crites y Tchobanoglous, 2000)

2.1.2.1 pH: El pH es un indicador de la acidez de una sustancia. Está determinado por el número de iones libres de hidrógeno (H⁺) en ella. La acidez o pH sirve como un indicador que compara algunos de los iones más solubles en las aguas y sustancias en general. (Lennotech, 2000).

El pH puede variar entre 0 y 14. Cuando el pH de una sustancia es mayor de 7, es una sustancia básica. Cuando el pH de una sustancia está por debajo de 7, es una sustancia ácida. Cuanto más se aleje el pH por encima o por debajo de 7, más básica o ácida será la solución. (Lenntech, 2000).

2.1.3 Constituyentes orgánicos:

La materia orgánica en aguas residuales se constituye principalmente de proteínas (40 - 60%), carbohidratos (25 - 50%) y grasas y aceites (8 - 12%) (Crites y Tchobanoglous, 2000). La materia orgánica presente en las aguas residuales se mide por las pruebas de Demanda Química de Oxígeno (DQO), Demanda Biológica de Oxígeno (DBO) y/o Carbono Orgánico Total (COT) (Ramalho, 1996)

La DQO y la DBO son parámetros de estado de “reducción” de la materia orgánica. Ambos análisis calculan la cantidad de oxígeno que se requiere para oxidar la materia orgánica, pero la DBO solo cuenta la fracción biodegradable, mientras que la DQO tiene en cuenta también la fracción no biodegradable. Es importante considerar que para un tratamiento el delta de DQO (ΔDQO) es igual al delta DBO (ΔDBO) (aunque en la práctica se encuentran discrepancias debido al método experimental). Así para los efectos de remoción de sustrato la DBO y la DQO son equivalentes, prefiriéndose la DQO por simplicidad de ejecución, además debe considerarse que a mayor cantidad de DQO mayor cantidad de contaminante de un residuo líquido (Salazar, 1993; Asociación de Ingenieros Sanitarios de Antioquia, 1993). Los diferentes procesos biológicos trabajan por lo general con uno sólo de estos parámetros, sea DQO o DBO para medición de consumo de sustrato (Ramalho, 1996). Así pues, la prueba de

DQO puede usarse como sustituto de la prueba de DBO (Crites y Tchobanoglous, 2000).

Las aguas residuales o sustratos sintéticamente preparados tienen un potencial de contaminación medido con la DQO. Así pues, para efectos de tratamiento biológico la DQO nos indica la cantidad de alimento que le entra a un determinado cultivo biológico. De este modo lo que es contaminación, para las bacterias es alimento. Las bacterias, al utilizar un compuesto con una DQO determinada, deben usar la energía en él disponible para sus reacciones metabólicas convirtiéndolo en un compuesto de menor energía. El sustrato consumido (Δ DQO) por medio del tratamiento biológico pasa a ser parte de la respiración celular (Δ O₂) y de biomasa (Salazar, 1993; Asociación de Ingenieros Sanitarios de Antioquia, 1993).

2.1.3.1 Demanda bioquímica de Oxígeno (DBO): Se define como DBO (Demanda Biológica de Oxígeno) de un líquido a la cantidad de oxígeno que los microorganismos, especialmente bacterias (aeróbicas o anaerobias facultativas: *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Aerobacter*, *Bacillus*), hongos y plancton, consumen durante la degradación de las sustancias orgánicas contenidas en la muestra. Se expresa en mg/L (ppm). Es un parámetro indispensable cuando se necesita determinar el estado o la calidad del agua de ríos, lagos, lagunas o efluentes. Cuanto mayor cantidad de materia orgánica contiene la muestra, más oxígeno necesitan sus microorganismos para oxidarla (degradarla). Como el proceso de descomposición varía según la temperatura, este análisis se realiza en forma estándar durante cinco días a 20 °C; esto se indica como DBO₅. Según las reglamentaciones, se fijan valores de DBO máximo que pueden tener las aguas residuales, para poder verterlas a los ríos y otros cursos de agua. De

acuerdo a estos valores se establece, si es posible arrojarlas directamente o si deben sufrir un tratamiento previo (Ferrero, 1974).

La DBO es el método usado con mayor frecuencia en el campo del tratamiento de las aguas residuales. Si existe suficiente oxígeno disponible, la descomposición biológica aerobia de un desecho orgánico continuará hasta que el desecho se haya consumido. La medición de la DBO se basa en tres reacciones químicas que se presentan en la oxidación de la materia orgánica (*ecuación 3*), síntesis de tejidos a partir de la energía liberada (*ecuación 4*) y respiración endógena de la fauna microbiana (*ecuación 5*). (Crites y Tchobanoglous, 2000).

Oxidación *Ecuación 3*

Síntesis *Ecuación 4*

Respiración endógena *Ecuación 5*

- **Limitaciones de la DBO:** Aunque la DBO_5 es una prueba comúnmente usada, tiene serias deficiencias. Una de ellas es la falencia presentada al no

tener carácter estequiométrico. Así en cinco días no se garantiza el consumo de todo el residuo. Otra limitación corresponde a la necesidad de aclimatar bacterias que sirvan como inóculo y problemas generales con la precisión del ensayo. Esta prueba posee baja reproducibilidad y valores menores a 2 mg/L son inciertos, por tanto se prefiere trabajar con la DQO (demanda química de Oxígeno) (Crites y Tchobanoglous, 2000).

2.1.3.2 Demanda Química de Oxígeno (DQO): La DQO es un parámetro que representa todos los compuestos orgánicos que se pueden oxidar. La concentración de DQO es una medida de la cantidad total de oxígeno que es necesaria para la oxidación de todos estos componentes en una solución. La DQO es eliminada por oxidación, de manera que el oxígeno necesario para esta oxidación puede provenir del oxígeno o del nitrato (Muñoz et al., 2000)

La DQO se usa para medir el material orgánico presente en las aguas residuales, susceptible de ser oxidado químicamente con una solución de dicromato de potasio en medio ácido. Desde el punto de vista operacional, una de las principales ventajas de la prueba de la DQO es el tiempo necesario para completarse la prueba (en la DBO se requieren mínimo 5 días, en este proceso sólo se requieren dos horas y media) (Sawyer et al., 1994)

2.2 RELACIONES ENTRE DBO Y DQO

Los valores de la relación DBO_5/DQO en aguas residuales no tratadas oscilan entre 0.3 y 0.8. Si la relación DBO_5/DQO es mayor a 0.5 se considera que estas aguas son fácilmente tratables por métodos biológicos. Si la relación es menor a 0.3 se considera que el residuo puede tener componentes tóxicos o requiere microorganismos aclimatados para su tratamiento. Las aguas con

relaciones entre 0.3 y 0.5 por lo general tienen un tratamiento preliminar o una sedimentación primaria (Crites y Tchobanoglous, 2000).

2.3 CALIDAD DEL AGUA

Los requerimientos de la calidad del agua varían de una industria a otra, dependiendo de las necesidades de la producción y de los procesos secundarios para los cuales esta se utiliza. Según la Federación de Control de la Polución en el Agua en USA (Water Pollution Control Federation, 1989) se requiere un agua neutra (pH entre 6.2 y 8.3), de baja turbidez, baja cantidad de sólidos suspendidos y de sílica (se consideran bajos la sílica y los sólidos suspendidos en concentraciones inferiores o iguales a 50 mg/L) (Water Pollution Control Federation, 1989).

El agua reutilizada generalmente se destina a procesos secundarios, ya que el color, la consistencia y la apariencia no son aptos para procesos principales. Por esto se utilizan en lavados, enjuagues u otros (Romero, 1996).

La normatividad ambiental es diferente para cada país. Existen países donde la normatividad es muy estricta debido a la concientización del gobierno sobre la protección ambiental, o en algunos casos, como en Estados Unidos e Inglaterra, la contaminación por la actividad industrial es alta y deben empezar a tomar medidas para evitar catástrofes ambientales irremediables.

Colombia es un país cuya normatividad ambiental es poco estricta, por esto puede decirse que a las empresas les cuesta poco contaminar, las tasas retributivas y los porcentajes de remoción son bajos. Sin embargo, el Ministerio

del Medio Ambiente ha empezado a tomar medidas y a realizar campañas para que las industrias tomen conciencia de disminuir la carga contaminante.

2.4 NORMATIVIDAD

Actualmente en Colombia los vertimientos de aguas residuales deben cumplir con unos parámetros, ya establecidos, antes de pasar a cualquier cuerpo de agua o a un alcantarillado público, estos parámetros están listados en el Decreto 1594/1984 en los artículos 72, 73 y 74. Sin embargo, para la calidad de las aguas a tratar son de mayor importancia los artículos 72 y 73 (Decreto 1594, 1984).

En el artículo 72 se tratan los vertimientos a un cuerpo de agua. Las condiciones mínimas que deben cumplirse son pH entre 5 - 7, temperatura inferior a 40°C, ausencia de material flotante, remoción de grasas y aceites igual o superior al 80%, remoción de sólidos mayor al 50% y remoción de DBO superior al 80%. Estos parámetros solo incluyen los vertimientos de aguas provenientes de la industria, no domésticos, ya que estos son lo que van a ser tratados (Decreto 1594, 1984).

En el artículo 73 se tratan los vertimientos a un alcantarillado público, las condiciones mínimas que deben cumplirse son: pH entre 5 - 7, temperatura inferior a 40°C, ausencia de ácidos, bases o soluciones que causen contaminación, sustancias explosivas o inflamables, presencia de sólidos sedimentables hasta en 10 mg/L, remoción de sólidos suspendidos y de DBO en un 80% (Decreto 1594, 1984).

La Compañía Global de Pinturas (CGP), es una empresa que esta altamente comprometida con el desarrollo de la zona donde se encuentra su planta de producción (Oriente Antioqueño, Rionegro); por esto, desarrolla proyectos para

la protección del entorno y del personal de la planta. Esta empresa nace en 1945 por iniciativa del Señor Germán Saldarriaga del Valle con el nombre de Pinturas Colombianas S.A. (Pintuco), sólo hasta el 2006 se cambia el nombre al querer unificar las nuevas marcas de pinturas y recubrimientos que hacen parte de la Compañía. Es una empresa Colombiana líder en el negocio de los recubrimientos, especialmente de pinturas base agua y base solvente. Esta empresa forma parte del grupo de grandes empresas Antioqueñas y hoy en día su planta principal se encuentra ubicada en la zona industrial de Rionegro, Antioquia, específicamente en el kilómetro 1 vía Belén – Rionegro (Uribe, 2007).

Entre sus valores se resalta la responsabilidad integral y por tanto su compromiso con el medio ambiente, la salud y seguridad del trabajador y la calidad de sus procesos y por ende de sus productos (Uribe, 2007).

2.5 TRATAMIENTOS BIOLÓGICOS PARA AGUAS RESIDUALES

Los tratamientos biológicos para aguas residuales son procesos que permiten la remediación de las aguas mejorando su calidad. Son básicamente los siguientes procesos (Saval, 1999):

2.5.1 “Land farming”: tratamiento de suelos que puede ser hecho “in situ” o “ex situ”. Consiste en la mezcla entre agentes biológicos y suelos para mejorar la cantidad de nutrientes en estos (Boopathy, 2000).

2.5.2 Compostaje: tratamiento aerobio con procesos termofílicos en los cuales el material contaminado se mezcla con un agente aglomerante (Boopathy, 2000).

2.5.3 Procesos de Biorreactores: biodegradación en un contenedor o reactor que utiliza fluidos (Boopathy, 2000).

2.5.4 Bioventing: tratamiento de suelos contaminados en el que el oxígeno estimula la actividad microbiana (Boopathy, 2000).

2.5.5 Biofiltros: uso de filtros microbiales para tratamiento de emisiones de aire (Boopathy, 2000).

2.5.6 Bioestimulación: simulación de cepas nativas y aguas para proveer de nutrición necesaria a estos (Boopathy, 2000).

2.5.7 Biorremediación intrínseca: biorremediación inasistida de contaminantes; sólo se hace un monitoreo regular (Boopathy, 2000).

2.5.8 Bombeo y tratamiento: Bombeo de aguas subterráneas a la superficie, tratamiento biológico y reinyección (Boopathy, 2000).

2.6 BIODEGRADACIÓN Y BIORREMEDIACIÓN

La biodegradación es la capacidad metabólica de los organismos para transformar o mineralizar contaminantes orgánicos en compuestos menos peligrosos y en menor cantidad, de tal manera que puedan integrarse fácilmente a los ciclos biogeoquímicos naturales. La biodegradación es medida con pruebas químicas y/o fisiológicas en recipientes conteniendo

cultivos puros de microorganismos, cultivos mixtos o muestras ambientales (suelo, agua o sedimento) (Vidali, 2001).

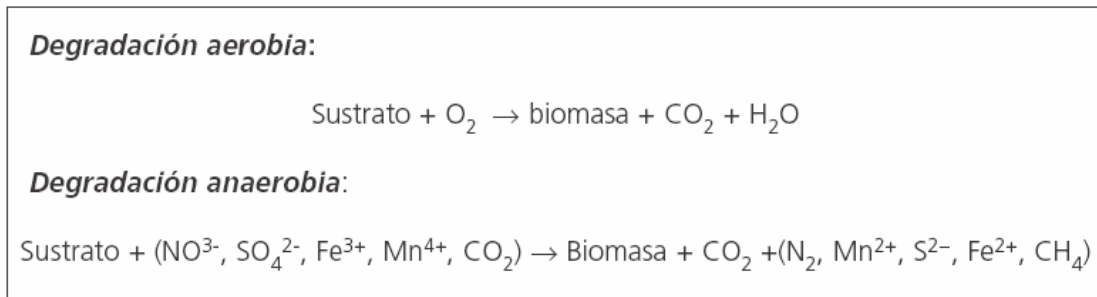
La biorremediación es la tecnología que tiene como objetivo acelerar la biodegradación natural de los compuestos orgánicos que han sido vertidos intencional o inadvertidamente al ambiente, mediante la optimización de las

condiciones limitantes de tal proceso (Vidali, 2001). La división fundamental de la biorremediación está sustentada en dos preguntas: ¿donde se metabolizarán los contaminantes? y ¿cuál es el sitio de remediación más apropiado?. Los procesos microbianos podrían degradar contaminantes ambientales *in situ*, donde ellos son encontrados, o *ex situ*, que requiere que los contaminantes sean movilizados, y en un estanque o recipiente se efectúe el tratamiento de los contaminantes (Gilio Vilca y Vigio Sal y Rosas, 2007)

De acuerdo a las definiciones, la biorremediación entonces acelera procesos biodegradativos basándose en la digestión de sustancias por parte de los microorganismos. Pero para que estos procesos metabólicos se lleven a cabo, y puedan ser utilizados como una técnica remediativa, será necesario que existan en el medio unas condiciones físico-químicas óptimas (Maroto y Rogel, 2004). La biorremediación utiliza por lo general bacterias, no obstante, existen casos aislados de utilización de otros tipos de organismos como, por ejemplo, los hongos y, más recientemente, las plantas (Amézaga, 2004).

El fundamento bioquímico de la biorremediación se basa en que en la cadena respiratoria (transportadora de electrones de las células) se producen una serie de reacciones de óxido-reducción cuyo fin es la obtención de energía. La cadena la inicia un sustrato orgánico (compuestos hidrocarburos) que es externo a la célula y que actúa como dador de electrones, de modo que la actividad metabólica de la célula acaba degradando y consumiendo dicha sustancia. Los aceptores más comúnmente utilizados por los microorganismos son el oxígeno, los nitratos, el hierro (III), los sulfatos y el dióxido de carbono. Cuando el oxígeno es utilizado como aceptor de electrones la respiración microbiana se produce en condiciones aerobias, y los procesos de biodegradación serán de tipo aerobio; sin embargo, si utiliza los sulfatos o el dióxido de carbono se produce en condiciones reductoras o anaerobias, y los procesos de biodegradación serán de tipo anaerobio (Marloto y Rogel, 2004). (Fig. 1)

Fig. 1 Tipos de degradación de contaminantes por Tratamiento biológico (Marloto y Rogel, 2004)



La concentración y composición de la comunidad microbiana y la tasa de transformación de contaminantes está influenciada por la necesidad de nutrientes que tienen los microorganismos (disponibilidad y asimilación de nutrientes), pH del medio (la mayoría de los microorganismos crecen a pH's entre 6 y 8), temperatura (en condiciones mesófilas, es decir, entre 15 y 45°C generalmente, se da mayor crecimiento de los microorganismos), la humedad (los microorganismos requieren unas condiciones mínimas de humedad para su crecimiento) y la estructura química del compuesto a degradar (Marloto y Rogel, 2004)

Cuando la transformación de los contaminantes llega hasta la generación de dióxido de carbono, se habla de una completa mineralización. Por supuesto, la eficiencia de la biodegradación depende del sitio, del contaminante y del daño causado. En algunas ocasiones se llega hasta sustancias que se reintegran al ambiente, mientras que en otras la complejidad química de los contaminantes supera a la capacidad de los microorganismos para metabolizar los

hidrocarburos. En estos casos, la biodegradación tarda varios, años, y a veces no se logra la completa degradación de los agentes nocivos (Saval, 1999).

Los procesos biológicos son económicos. Los costos de inversión de estos son de 5 - 20 veces menores que los costos de procesos químicos y los costos del proceso son 3 - 10 veces menores (Crites y Tchobanoglous, 2000).

2.7 BACTERIAS, LOS MICROORGANISMOS MÁS IMPORTANTES EN PROCESOS BIORREMEDIATIVOS

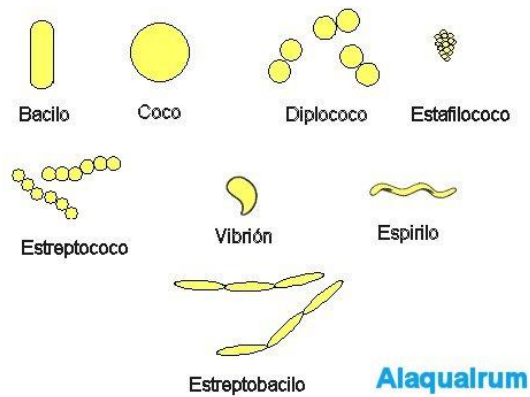
Son organismos vivos, de tamaño microscópico, que constan de una sola célula, y su proceso vital así como funciones, son similares a las de los vegetales. Algunas bacterias son móviles y otras son inmóviles. Requieren así como todos los seres vivos alimento, oxígeno y agua. Solo pueden existir cuando el medio ambiente provee estas necesidades. Como resultado de sus procesos vitales las bacterias dan origen a productos de desecho (Departamento de Sanidad del Estado de New York, 1998).

Las bacterias están compuestas en un 75 - 80% de H₂O y un 20% de material seco, del cual 80-90% es orgánico. La composición química aproximada es C₅H₇NO₂, lo que significa que aproximadamente la mitad de la parte orgánica es carbono. Los compuestos inorgánicos principales son: P₂O₅ (50%), Na₂O (11%), CaO (9%), MgO (8%), K₂O (6%) y Fe₂O₃ (1%) (Salazar, 1993; Asociación de Ingenieros Sanitarios de Antioquia, 1993).

Las bacterias pueden ser esféricas, cilíndricas y espirales. Las esféricas pueden estar individualmente (cocos), por pares (diplococos), en ramillete

(estafilococos) o formando cadenas (estreptococos). Las cilíndricas pueden venir individualmente (bacilos) o en cadenas (estreptobacilos); los espirales (espirilos) se mantienen desunidas de otras compañeras (Salazar, 2003; Asociación de Ingenieros Sanitarios de Antioquia, 1993). (Fig. 2)

Fig. 2 Formas de las bacterias (CFGM Farmacia, 2007).



El medio ambiente de las bacterias es muy importante para su supervivencia. El pH debe estar preferiblemente entre 6.5 y 7.5. La temperatura puede fluctuar entre -2°C y 75°C de acuerdo con la subdivisión mostrada en la tabla 1. Las tasas de reacción metabólicas en general, se incrementan en 10°C dentro de los rangos presentados (Crites y Tchobanoglous, 2000).

Si las bacterias son móviles, tienen flagelos que son apéndices de unos 20 nm. de longitud (Salazar, 1993; Asociación de Ingenieros Sanitarios de Antioquia, 1993). En general, la estructura celular está bastante entendida, conociéndose

gran parte de los componentes de los diversos sistemas celulares y su modo de operación.

Tabla 1. Tipos de bacterias según la temperatura del medio (Crites y Tchobanoglous, 2000)

Tipo de Bacteria	Temperatura media	Optimo
Criofílicas	2 - 20	12 - 18
Mesofílicas	20 - 45	25 - 40
Termofílicas	4 - 75	55 - 65

Las bacterias se clasifican también de acuerdo a la composición de su pared celular en bacterias Gram positivas o bacterias Gram negativas. Las primeras tienen una pared celular con una red de mureína muy desarrollada, sus aminoácidos varían de una especie a otra y en general se encuentran en ella los aminoácidos L-diaminopimélico y lisina, tienen polisacáridos unidos por enlaces covalentes y está constituida también por ácidos teicónicos. Su contenido protéico es bajo. Las bacterias gram negativas tienen una red de mureína de una sola capa, sólo contienen aminoácido meso-diaminopimélico y no tienen lisina, tienen mucha cantidad de proteínas y no se han encontrado en ellas ácidos teicónios. Esta constitución de la pared es la que hace que al teñir las células se evidencie diferente coloración para las bacterias Gram negativas y Gram positivas. Tras el proceso de tinción las bacterias Gram positivas se tiñen de Violeta y las Gram Negativas de rosado. (Crites y Tchobanoglous, 2000).

2.8 ADAPTACIÓN MICROBIANA

La adaptación microbiana es un proceso mediante el cual se estabiliza la población microbiana que va a actuar sobre los efluentes a tratar; este proceso

es importante, debido a que las condiciones iniciales del efluente deben estabilizarse en cuanto a parámetros como: fase de inducción (lag o latencia), estabilización del pH, dilución de nutrientes, estabilización del porcentaje DBO/DQO, competencia por nutrientes, co-metabolismo y metabolismo. Estos factores afectan el rendimiento de poblaciones bacterianas que quieran ser introducidas para degradar los efluentes (Benavides, 1999)

2.9 CINÉTICA Y CRECIMIENTO BACTERIANO

Las bacterias se reproducen por fisión binaria, de manera sexual o por gemación. En general lo hacen por fisión binaria, mecanismo en el cual una célula original se convierte en dos organismos nuevos. El tiempo requerido para cada división, conocido como tiempo de generación, puede variar desde aproximadamente 20 minutos hasta varios días. Sin embargo, es importante destacar que las bacterias no siguen creciendo indefinidamente debido a limitaciones ambientales, como disponibilidad del sustrato, concentración de nutrientes, o incluso, el tamaño del sistema (Salazar, 1993; Asociación de Ingenieros Sanitarios de Antioquia, 1993).

La cinética bacteriana sigue un patrón general de crecimiento, tanto en número de bacterias como en masa bacteriana, la cual se puede describir con las siguientes fases (Crites y Tchobanoglous, 2000):

- Fase de latencia: Las bacterias requieren de un tiempo para aclimatarse y adaptarse tras la inoculación en un medio de cultivo.
- La fase exponencial: Las células crecen de forma exponencial y se reproducen.

- La fase estacionaria: el crecimiento de las células nuevas se compensa con las células muertas, debido al agotamiento de sustratos o de nutrientes necesarios para su crecimiento o a la producción de componentes inhibitorios.
- La fase de muerte exponencial: la tasa de mortalidad de las bacterias excede la producción de células nuevas. La tasa de mortalidad es función de la población viable y de las características ambientales.

Las relaciones cinéticas tratan de encontrar los parámetros que gobiernan o definen las tasas de cambio de los parámetros que importan en el tratamiento de aguas residuales. Específicamente son de interés la velocidad de remoción de sustrato y la tasa de aumento de biomasa. Matemáticamente los parámetros que intervienen en este fenómeno son:

F	=	Concentración de sustrato orgánico (mg DQO o DBO/L)
X	=	concentración de biomasa (mg/L)
	=	Velocidad de remoción de sustrato (mg DQO/L*día)
	=	Velocidad de aumento de biomasa (mg biomasa/L*día)

De esta manera encontrar las leyes que rigen estos parámetros son importantes pues ayudan a diseñar procesos y métodos de control biológicos (Crites y Tchobanoglous, 2000).

2.10 ANTECEDENTES DE TRATAMIENTO BIOLÓGICO CON BACTERIAS

Existen numerosas investigaciones sobre biodegradación en el campo científico. A continuación se presentan algunas investigaciones de biodegradación con colorantes, aguas de alta carga de DQO y polímeros, pues estas investigaciones se dirigen a la disminución de la DQO y por tanto de la carga contaminante de las aguas.

En cuanto a trabajos reportados para la degradación de colorantes de Trifenilmetanos Sandhya *et al.*, 2005, trataron los efluentes que contenían azul-ácido 15 como colorante con bacterias. Se realizó un procedimiento basado en la biodegradación de la sustancia en un reactor de células inmovilizadas. Se logró la decolorización de este trifenilmetano en un 94% utilizando un flujo de 4 mL/h y microorganismos como *Bacillus sp*, *Alcaligenes sp*, y *aeromonas*. Estos microorganismos utilizaron los trifenilmetanos como fuentes de carbono al incorporarse en un medio artificial y se evidenció la degradación de la sustancia estudiada por medio de los análisis químicos realizados por espectroscopia NMR y cromatografía. La decoloración del colorante se logró por medio de la demetilación. Este mismo autor en el 2001, logró degradar en un 92.4% la DQO de un efluente que contenía colorantes azo con un consorcio microbiano compuesto en un gran porcentaje de *Hidrogenophaga palleronii*; además, Lima, *et.al.*, 2001 degradaron colorantes azo utilizando *Phanerochaete chrysosporium* y obtuvieron degradaciones promedio del 80%. Se reportan en la literatura otros microorganismos como *Pseudomonas i.e*, *Pseudomonas alcaligenes*, *P. mendocina* y *P. stutzen* en tratamientos similares (Mehmetoglu *et al.*, 2003; Sgountzos *et al.*, 2006)

Adicionalmente, Talarposhti *et. al.*, 2000 lograron reducir la DQO de un efluente textil en un 70% , mostrando la reducción en la carga contaminante del efluente, además, se logró remover la mezcla de colorantes formada de: Amarillo Básico 28, Amarillo Básico 21, Rojo Básico 18.1, y otros colorantes básicos violeta y azul en un 90% con microorganismos en consorcio comercial.

Para el caso del trifenilmetano violeta de metilo, Sharma *et al.*, 2006 lograron una decolorización del 98% con *Pseudomonas mendocina* MCM B-402. El proceso general que se siguió fue el siguiente: El Violeta de Metilo se trató con la *Pseudomona* mencionada y se obtuvieron metabolitos no identificados, posteriormente de estos metabolitos en el medio se obtuvo fenol que se degradó por el contacto con el microorganismo a ácido β -ceto adípico y posteriormente este se descompuso a dióxido de carbono (CO₂). Así pues, el producto final de la degradación del trifenilmetano violeta de metilo fue el CO₂, indicando una completa degradación del colorante.

Otra técnica para la remoción de carga contaminante y color de los efluentes es la remoción del color con células enteras. Esta es una técnica biotecnológica para la degradación de colorantes de aguas residuales de la industria textil usada desde hace algunos años. Este es un proceso que utiliza la biocatálisis microbial para reducir los colorantes presentes en el efluente. Estas células metabolizan los colorantes azo y así se logra la decolorización y biodegradación de estas sustancias en las aguas residuales. En los reportes literarios se ha trabajado principalmente con células de *Bacillus cereus*, *Sphaerotilus natans* y *Arthrobacter sp* para degradar tintes azo; *Alcaligenes faecalis* y *Commomonas acidovorans* para degradar tintes reactivos, diazo, dispersiones de tintes y cianinas. Los microorganismos *Alcaligenes faecalis*, *Commomonas acidovorans* también se han utilizado para degradar Remazol Negro B; las *Pseudomonas*

para degradar Naranja G, Amido Negro 10B, Rojo Directo 4BS y Rojo del Congo; *Bacteroides fragillis* para degradar Naranja II, tartrazina y Colorante Amaranth, y entre otras (Pearce *et al.*, 2003).

He Fang *et al.*, 2004 utilizaron un consorcio microbiano compuesto por *Pseudomonas 1-10* y white-rot fungi 8-4. Los estudios concluyeron que la cinética de decolorización de 4BS por el consorcio tuvieron mejores resultados a un pH entre 4 - 9, temperatura entre 20 - 40 °C. La biodegradación con colonias puras obtuvo decolorizaciones máximas del 90% y el consorcio obtuvo decolorizaciones de 100%. Los valores de DQO se redujeron desde 37 mg/L hasta 5 mg/L. De esta manera se evidenció degradación de los contaminantes del medio, pues al reducir la DQO se reduce la carga contaminante. Esta reducción equivale a una degradación del 86.47% aproximadamente.

En el mismo sentido de las investigaciones ya presentadas Ambrosio y Takaki, 2004, reportaron la decolorización de los reactivos azo por medio del hongo *Cunninghamella elegans* UCP 542. Se utilizaron los colorantes naranja II, negro 5, rojo 198 y una mezcla de ellos en presencia y/o ausencia de peptona y sacarosa. La decolorización dio como resultado una proporcionalidad con el tiempo de incubación, la estructura molecular del colorante y la presencia de co-sustratos; esto demuestra que estos microorganismos son altamente selectivos, se logró metabolizar 85% del colorante después de 24 horas de incubación.

Para derivados del petróleo y polímeros se encontraron investigaciones que permiten corroborar la eficiencia de los métodos biológicos.

Pazarlioglu y Telefoncu, 2004 biodegradaron fenol con *Pseudomona putida* inmovilizada. Se lograron niveles de degradación máximos de 99% con

bioreactor de lecho empacado y en un sistema de “shakers” se logró degradar el fenol (en concentración de 1 g/L) completamente en 22 horas. Este proyecto se extendió a la degradación de benceno y tolueno con el mismo microorganismo, así Mehmetoglu et. al., 2003 degradaron las sustancias en procesos de adaptación de la bacteria a los contaminantes, logrando total degradación del benceno y tolueno en concentraciones de 90 mg/L en 24 horas y del fenol en concentración de 30 mg/L en 18 horas.

Adicionalmente Li et al., 2007. biodegradaron fenol utilizando *Fusarium sp*, microorganismo que utiliza el fenol como fuente de carbono y logra su degradación en las aguas. Se obtuvo Cathecol como intermediario y el proceso logró degradaciones de fenol del 100%.

Para tratamiento de biorremediación para petróleo se encontró que Mukherjee et al., 2006, lograron la degradación de petróleo con las cepas *B. subtilis* y *P. aeruginosa*. Haciendo una comparación de los resultados obtenidos con ambas cepas se pudo concluir que la *P. aeruginosa* fue más eficiente que el bacilo.

Los autores Banat et al., 2006, trabajaron procesos de tratamiento biológico con otras sustancias derivadas del petróleo: los alcanos y lograron la degradación de alcanos tipo hexadecanos en el suelo con la cepa *Geobacillus thermoleovorans*. Se varió la temperatura y se observó que a temperaturas mayores a los 60°C se puede lograr una mejor degradación que con el mismo microorganismo a temperaturas mas bajas.

Por su parte Sudhakar et al., 2007. Degradaron HDPE (Polietileno de Alta densidad), PP (polipropileno) y LDPE (Polietileno de Baja Densidad) de las aguas de la Bahía de Bengal con *Pseudomonas sp*. Utilizando biofouling y biodegradación. Se controló la degradación con medida de peso de las muestras

y se pudo observar que la mayor pérdida de peso se presentó en LDPE, logrando así mayor degradación de este polímero.

Además Kushmaro *et al.*, 2007. investigaron la biodegradación de dibromoneopentil glicol (DBNFG) por un consorcio bacteriano y se observó total mineralización del compuesto. Se encontró además que al menos siete (7) especies bacterianas tienen capacidad de degradar este compuesto.

Fernández *et al.*, 2005 trataron aguas residuales industriales empleando una mezcla de microorganismos. Se encontró que la remoción de carga orgánica y contaminantes depende del tipo de sustrato (del agua residual). Se estudió la cinética de proceso por métodos respirométricos. Se llegó a la conclusión que cada sustrato motiva a la degradación de un compuesto determinado.

En cuanto a tratamientos para poli sodio acrilato Katsuragi *et al.*, 2003. encontraron que el PSA puede ser degradado por un consorcio de varias especies de bacterias. Este consorcio fue denominado. L7-98 y utiliza el PSA como la única fuente de carbono del medio. Los resultados sugieren que la degradación del PSA envuelve los siguientes pasos: 1) oxidación del grupo metileno a grupo Carboxilo 2) descarbonilación a la forma aldehído 3) dehidrogenación a la forma de doble enlace entre la unidad terminal y la próxima 4) Oxidación del grupo aldehído al carboxilo y eliminación del ácido acético. Por lo tanto se logró mineralización completa del polímero.

3. METODOLOGÍA

3.1 MATERIALES Y EQUIPOS

3.1.1. Reactivos

- Agar nutritivo de Merck
- NaOH 0.25 N
- HCl 0.2 N
- Agua destilada
- Agar Ogy de Merck, Agar Sabouraud de Merck, Agar cetrymide de Merck, Caldo nutritivo de Merck
- Aguas residuales provenientes de la Planta Base Agua de la CGP.
- Sulfato de Plata Carlo Herba
- Dicromato de Potasio Merck
- Ácido sulfúrico Sigma
- 1,10 Fenantrolina Merck
- Sulfato ferroso Merck
- Cristal violeta Merck
- Lugol
- Safranina
- Alcohol-cetona
- Agua inóculo para DBO
-

3.1.2. Equipos

- Asa bacteriológica

- Autoclave horizontal EASTERN modelo EA -620 T
- Balanza Adventurer™ OAUS con precisión 0.01 gr.
- Bomba de filtración BÜCHI.
- Centrifuga universal marca Hettich
- Digestor para medición de DBO Laboratorios Dr. Calderón.
- Espátula de Drigalski
- Espectrofotómetro Helios Gamma. UV-Visible de la marca Cole Parmer.
- Filtros de 0.2 µm, 0.45 µm, filtros tipo cualitativo
- Horno Jeiotech OF-026
- Incubadora WTBinder
- Material volumétrico: beakers, erlemeyers, balones volumétricos, probetas, cajas petri etc.
- Micropipeta 1 mL, 10mL, 100mL.
- Microscopio binocular marca Ecko
- pH-metro Metrohm.
- Shaker New Brunswick Science
- Termoreactor Spectroquant TR420 de Merck
- Tubos eppendorff, tubos falcon 20 mL y 45mL.

3.2 LOCALIZACIÓN

Las cinéticas, pruebas y los análisis correspondientes a este trabajo se llevaron a cabo en los laboratorios de Biotecnología, Fenómenos Químicos y Fotocatálisis de la Universidad EAFIT en la ciudad de Medellín.

3.3 AGUA RESIDUAL

El agua residual empleada en el desarrollo de este proyecto provino de la planta de pintura base agua de la Compañía Global de Pinturas (CGP) ubicada en Rionegro - Antioquia, la cual fue sometida a un proceso de clarificación con polímeros NOVA (Polímero nova A- 410 y Polímero C-225) (anexo I). El agua contiene cal, residuos de pinturas base agua, y polímeros clarificantes y fue caracterizada en CORNARE (Corporación Autónoma Regional Rionegro-Nare) (anexo II). El transporte del agua, desde la planta hasta el laboratorio, se realizó en canecas plásticas de 5 galones herméticamente selladas y fueron almacenadas en el laboratorio a temperatura ambiente hasta su posterior uso. Previo a su utilización, el agua fue sometida a una serie de ensayos preliminares de pH y esterilización.

3.4 MICROORGANISMOS

Para el tratamiento biológico se utilizaron microorganismos aislados de las aguas residuales de la Planta Base Agua de la Compañía Global de Pinturas (CGP)-Rionegro y microorganismos de un consorcio comercial de la empresa Orius Biotecnología denominado Bacthon® SC.

3. 5 ENSAYOS PRELIMINARES PARA EL AGUA RESIDUAL

3.5.1 pH (buffers): El agua residual fue expuesta a diferentes pH's con el fin de observar la presencia de compuestos intermedios y/o cambios de color. Para la prueba de pH's se emplearon diferentes buffers con diferentes pH's (Buffer citrato pH 3; Buffer fosfato pH 5, 6 y 7; Buffer Borato pH 9 y 10.). A 10 ml de cada buffer se le adicionaron 10 mL del agua problema, se midió el pH real de mezcla con el pH-metro y se dejaron en el "shaker" por 48 horas a 150 rpm. Se

evaluó cualitativamente la aparición de precipitados y los posibles cambios en la coloración del agua debido al cambio en el pH.

3.5.2 Esterilización del agua: Para la esterilización del agua problema se probaron diferentes métodos: esterilización con U.V., esterilización por filtración y esterilización con vapor.

3.5.2.1 Esterilización con radiación U.V.: En la esterilización con U.V. se dejaron 10 mL del agua problema sobre una caja Petri abierta expuesta a radiación u.v. por 24 horas, para este ensayo se empleo una lámpara TUV 15W/G15T8 de Philips de una longitud de onda de 295 nm. (Becker *et al.*, 1996)

3.5.2.2 Esterilización por filtración: En la esterilización por filtración se pasó el agua problema por varios filtros con diferente tamaño de poro (filtro cualitativo, 0,45 μm , 0,25 μm), iniciando con el de filtro cualitativo, siguiendo con el de 0,45 μm y finalizando con el de 0,25 μm ; para la filtración se empleó una bomba de vacío para filtración BÜCHI con el fin de facilitar el paso del agua por los filtros. Todo el procedimiento se llevó acabo en condiciones estériles. Tanto los filtros como el soporte para estos y los recipientes en que se depositaba el agua fueron previamente esterilizados con vapor y todo se trabajó en la cámara de flujo laminar. (Becker *et al.*, 1996)

3.5.2.3 Esterilización por calor: Se esterilizaron 10 mL de agua residual por calor con vapor de media presión (15 psig) a 121°C por 15 minutos en el autoclave horizontal (Becker *et al.*, 1996)

Tras someter el agua problema a los diferentes métodos de esterilización 100 µl del agua se vertieron en cajas Petri con agar nutritivo. La muestra fue extendida por toda la caja, con la ayuda en una espátula de Drigalski previamente esterilizada, hasta secar completamente el agua sembrada.

Posteriormente las cajas fueron invertidas para evitar condensación sobre la superficie del medio de cultivo, e incubadas a 30°C por 72 h (Blondeau y Paris, 1998).

3.6 MEDIOS DE CULTIVO

Para el aislamiento de las cepas se emplearon cuatro medios diferentes (tablas 1-5): Agar Ogy y Agar Sabouraud (selectivos para hongos y levaduras), Agar Cetrimide (selectivo para *Pseudomonas*) y Agar nutritivo (medio rico para crecimiento de cualquier microorganismo sea: bacteria, hongo o levadura).

Tabla 2. Agar nutritivo (Merck, 1996)

Compuesto	Composición (g/L)
Peptona de Carne	5.0
Extracto de carne	3.0
Agar-Agar	12

Tabla 3. Agar Cetrimide (Merck, 1996)

Compuesto	Composición (g/L)
Peptona de gelatina	20.0
Cloruro de Magnesio	1.4
Sulfato Potásico	10.0
n-Cetil-N,N,N-trimetilamonibromuro	0.3
Agar-Agar	13.0
Glicerina	10 (mL/L.)

Tabla 4. Agar Ogy (agar Oxitetraciclina-Glucosa-Extracto de levadura) (Merck, 1996)

Compuesto	Composición (g/L)
Extracto de levadura	5.0
D(+) Glucosa	10.0
Agar-Agar	15.0
Oxitetraciclina	0.1

Tabla 5. Agar Sabouraud (Merck, 1996)

Compuesto	Composición (g/L)
D(+) Glucosa	40.0
Agar-Agar	15.0
Peptona	10

Para la preparación de los preinoculos se empleó caldo nutritivo como medio de cultivo.

Tabla 6. Caldo Nutritivo (Merck, 1996).

Compuesto	Composición (g/L)
Peptona de carne	5.0
Extracto de carne	3.0

3.7 PROCESO DE AISLAMIENTO DE LAS CEPAS NATIVAS

El aislamiento de cepas nativas del agua residual fue realizado según el método de dilución seriada y por el método de siembra en superficie en medios de cultivo selectivos.

3.7.1 Método de dilución seriada: Este método consiste en transferir 100 μL de agua residual en 900 μL de agua destilada y estéril (dilución 1/10). Dicha solución se mezcló apropiadamente en un vortex por 1 minuto, para la posterior transferencia de 100 μL de la solución 1/10 a 900 μL de agua destilada estéril (dilución 1/100) y así sucesivamente hasta llegar a una dilución 1/1'000.000.

3.7.2 Cultivo en medios selectivos: La siembra del agua residual se realizó por el método de siembra por superficie o por extensión para recuento de unidades formadoras de colonia. Para ello se vertieron 100 μL de cada dilución seriada en cajas Petri con 20 mL de diferentes medios de cultivo selectivos; Agar Ogy, Agar Sabouraud y Agar Nutritivo previamente esterilizados a 121°C y 15 psig. El pH del medio no se ajustó. La muestra fue extendida por toda la caja, con la ayuda en una espátula de Drigalski previamente esterilizada, hasta secar completamente el agua sembrada. Posteriormente las cajas se invirtieron para evitar condensación sobre la superficie del medio de cultivo, e incubadas a 30°C por 72 h.

Una vez obtenido el crecimiento de las colonias se tomaron colonias individuales y se sembraron en los medios de cultivo específicos por el método francés por superficie. Este método consiste en tomar una colonia con un asa bacteriológica y esparcirlo por la superficie del agar dibujando un zig-zag. Posteriormente las cajas se invirtieron para evitar condensación sobre la superficie del medio de cultivo, e incubadas a 30°C por 72 horas (Blondeau y Paris, 1998; Becker *et al.*, 1996). El proceso de aislamiento se hizo utilizando un sistema de control de contaminación, este sistema consiste en adicionar al experimento dos cajas Petri, una se coloca en la cámara de flujo laminar abierta completamente y otra se deja cerrada para evaluar contaminación en el medio de cultivo.

3.8 CONSERVACIÓN DE LAS CEPAS AISLADAS

Las cepas aisladas se trasladaron a Agar Nutritivo para su conservación y se almacenaron a -4°C , para esto se empleó el mismo método de siembra de francés por superficie. Las cepas se repicaron mensualmente por el método de siembra Francés en agar nutritivo para evitar la muerte celular (Fong y Tang, 2000).

Todo este trabajo de aislamiento por siembra en medios sólidos se llevó a cabo en condiciones estériles, por duplicado o triplicado y con un medio control de cámara y un medio control de medio, para evidenciar posibles contaminaciones externas.

3.9 TÉCNICAS ANÁLITICAS

3.9.1 Medición de biomasa: La medición de la biomasa para el monitoreo de las cinéticas se hizo mediante la técnica de la Densidad Óptica (OD), una medida de biomasa indirecta. Con el fin de relacionar la masa indirecta con una medida de masa directa, como es el peso seco, se realizaron curvas de OD vs. Peso seco.

3.9.1.1 Densidad óptica: Para las mediciones de densidad óptica se tomaron muestras de 1 mL del cultivo en eppendorfs de 2 mL y se centrifugaron a 14000 rpm durante 20 minutos. Los sobrenadantes se recuperaron y se almacenaron en eppendorfs correctamente marcados a (-4°C) para llevar a cabo las pruebas de caracterización del agua descritas más adelante. Los pellets se resuspendieron en 1 mL de agua desionizada y se leyó la OD en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm. La selección de esta longitud de onda se hizo de manera arbitraria, aunque se tuvo en cuenta que la literatura recomienda emplear longitudes entre 400 - 600nm para determinar la densidad celular (Becker *et al.*, 1996).

3.9.1.2 Técnica de medición por peso seco: Para las mediciones de biomasa por peso seco se tomaron muestras de 1 mL del cultivo en eppendorfs de 2 mL previamente secados en la mufla a 50 °C durante 24 horas y pesados, y se centrifugaron durante 20 minutos a 14000 rpm. Se descartó el sobrenadante y se sacaron los eppendorfs a la mufla por 24 horas. Una vez transcurrido el tiempo necesario, se pesaron los eppendorfs y la diferencia entre el peso del eppendorf lleno y el eppendorf vacío corresponde al peso de la biomasa, según la siguiente ecuación:

Ecuación 6.

3.9.1.3 Curvas de calibración de absorbancia vs. Peso seco: Las cepas seleccionadas, y los consorcios se cultivaron en 50 mL de caldo nutritivo en erlenmeyers de 250 mL a 250 rpm y 27 °C por 24 horas. Finalizando el período de incubación se tomaron muestras del cultivo y se realizaron diferentes diluciones (10/10, 8/10, 6/10, 4/10, 2/10, 1/10 mL de cultivo/mL de solución) empleando agua desionizada. De cada dilución se tomaron muestras de 1 mL en un eppendorf para la medición de densidad óptica (numeral 3.9.1.1) y peso seco (3.9.1.2). Finalmente se graficaron los valores obtenidos de peso seco Vs. absorbancia.

3.9.2 Caracterización del agua residual: Para caracterizar el avance de la degradación de carbono orgánico total en el agua problema se emplearon las pruebas de DQO (demanda química de oxígeno) y de DBO₅ (demanda bioquímica de oxígeno en 5 días); esta última se emplea además

para determinar el cumplimiento de la normatividad (decreto 1594 de 1894, Anexo III). Estas pruebas se realizaron en CORNARE (Ver Anexo II, caracterización del agua). Además en el laboratorio se realizaron otras mediciones de DQO para tener puntos de partida para el inicio del proyecto y conocer diferencias entre los métodos utilizados en CORNARE y los utilizados en la Universidad EAFIT.

3.9.2.1 Medición de DQO: La prueba de DQO se llevó a cabo mediante el método de reflujo cerrado con el método titulométrico (Ferrero, 1974). Para las mediciones se tomaron 2.5 mL de una dilución 1:10 de los sobrenadantes provenientes de cinéticas descritas más adelante, adicionalmente se agregaron 1.5 mL de la solución digestora de dicromato de potasio 0.0167 M y 3.5 mL del reactivo de ácido sulfúrico (5.5 g Ag_2SO_4 / Kg H_2SO_4) y se pasaron al termoreactor en donde se sometieron a una temperatura de 148 °C por 2 horas.

Posteriormente las muestras se enfriaron y titularon en una bureta de émbolo utilizando una solución indicadora de ferroína como titulador y una solución FAS (sulfato de amonio) 0.1M como titulante. Este ensayo se realizó por duplicado y se hace un blanco consistente de 2.5 mL de agua destilada en lugar del mismo volumen de muestra. Previo a este procedimiento, fue necesario hacer una calibración del FAS empleando una solución compuesta por 5 mL de solución digestora y 10 mL de agua desionizada, se agrega el indicador (ferroína) y se titula con la bureta de émbolo.

Para el cálculo de la DQO se utilizó la ecuación 7:

Ecuación 7 (APH, AWWA, WPCF 1992)

Donde:

M: concentración del FAS,

Ecuación 8 (APH, AWWA, WPCF 1992)

A: mL de FAS en titulación del blanco

B: mL de FAS en titulación de la muestra

f: Factor de dilución.

3.10 SELECCIÓN Y ADAPTACIÓN DE CEPAS MICROBIANAS

3.10.1 Preparación de los preinóculos: Los preinóculos se realizaron adicionando dos asadas de la cepa correspondiente en 50 mL de Caldo Nutritivo previamente esterilizado a 121°C y 15 psig en erlenmeyers de 250 mL. Estos se incubaron a 150 rpm, $27 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas.

3.10.2 Selección de cepas microbianas: La selección de las cepas microbianas se realizó evaluando la cinética de crecimiento y el porcentaje de degradación de DQO, en el agua residual con 1 g/L de Caldo Nutritivo esterilizado a 121°C y 15 psig. Las cinéticas de crecimiento bacterial se llevaron a cabo con un pH inicial de 6.0 (ajustado con NaOH 0.25 N), a 150 rpm, $27 \pm 2^\circ$

C y con un volumen de preinóculo equivalente al 10% del volumen total del medio líquido (20 mL) (ver numeral 3.10.1 para la preparación de preinóculos).

Una vez inoculada el agua residual (180 mL) se tomaron muestras cada dos horas a las cuales se les midió OD₅₄₀ (Basu *et al.*, 1996), y los sobrenadantes de las muestras iniciales y finales se almacenaron a -4° C para la determinación de DQO. La toma de muestras, al igual que las fermentaciones líquidas, se hicieron por duplicado. Adicionalmente se realizaron tinciones Gram (anexo IV) y plateos por superficie en Agar Nutritivo para evidenciar posibles contaminaciones.

3.10.3 Adaptación de las cepas microbianas: La adaptación de las cepas se realizó evaluando cuatro cinéticas consecutivas de crecimiento microbiano, y la degradación de DQO en agua residual con concentraciones descendientes de caldo nutritivo (CN) (Tabla 7). Todas la fermentaciones líquidas se llevaron a cabo con un pH inicial de 6.0 (ajustado con NaOH 0.25N), a 150 rpm, 27± 2° C.

Tabla 7. Tratamientos de adaptación.

TRATAMIENTO	Medio de cultivo	Microorganismos
T1	Agua residual + 1 g/L CN	Cepas seleccionadas
T2	Agua residual + 0.6 g/L CN	
T3	Agua residual + 0.3 g/L CN	
T4	Agua residual + 0 g/L CN	

El medio de cultivo se inoculó con un volumen de preinóculo proveniente del tratamiento anterior e equivalente al 10% del volumen total del medio líquido (20 mL) y con una OD₅₄₀ igual a 1.0.

Para ajustar la densidad óptica en 1.0 se realizaron los cálculos correspondientes según la ecuación 9.

Ecuación 9.

Donde:

A_1 : OD_{540} del cultivo de preinóculo

V_1 : volumen tomado del cultivo de preinóculo

A_2 : OD_{540} igual a 1.0

V_2 : volumen que se requiere inocular (20 mL)

El volumen V_1 se depositó en un tubo falcon estéril de 45 mL y se centrifugó a 2000 rpm durante 60 min. El sobrenadante fue descartado y el pellet fue resuspendido en el agua residual estéril hasta completar 20 mL.

Una vez inoculado el medio de cultivo (180 mL) se tomaron muestras cada dos horas a las cuales se les midió OD_{540} , y los sobrenadantes de las muestras iniciales y finales se almacenaron a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ para la determinación de DQO. La toma de muestras, al igual que las fermentaciones líquidas, se hicieron por duplicado. Adicionalmente, se realizaron tinciones Gram (anexo IV) y plateos por superficie en Agar Nutritivo para evidenciar posibles contaminaciones.

La adaptación de las cepas se hizo para cada una de las cepas seleccionadas como cepas de trabajo.

3.10.3.1 Diseño de experimentos y análisis estadísticos para los ensayos preliminares: Los ensayos preliminares tuvieron un diseño de experimentos unifactorial (cepa microbiana) con 7 niveles y 3 variables de respuesta (μ_{\max} , porcentaje de reducción de DQO y densidad óptica). Se realizó el análisis estadístico en Statgraphics 5.1 por el método del análisis de varianza (ANOVA) unifactorial, con un nivel de confianza del 95% el cual sirve para determinar diferencias significativas entre las variables dependientes.

Las cepas estudiadas fueron la 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7.

3.10.3.2 Diseño de experimentos y análisis estadísticos para la adaptación de las cepas microbianas: Para los tratamientos de adaptación se desarrolló un diseño de experimentos de dos factores (cepa microbiana y concentración de caldo nutritivo) con 4 niveles para cada uno, 3 variables respuesta (μ_{\max} , porcentaje de reducción y densidad óptica). El análisis estadístico realizado es un análisis multifactorial ANOVA con un nivel de confianza del 95%, el cual sirve para comparar si los valores de velocidad específica máxima de crecimiento (μ_{\max}), crecimiento de biomasa (OD_{540}) y el % de reducción de DQO obtenidos al variar las cepas y las concentraciones de caldo nutritivo en el agua problema, son similares o significativamente diferentes.

Los factores de estudio fueron las cepas evaluadas como cepas 1, 3, 4, 7 y las concentraciones de caldo nutritivo en el agua problema evaluadas en 1g/L, 0.6g/L, 0,3g/L y 0g/L. Las variables de respuesta fueron: concentración de biomasa una vez las cepas alcanzan la fase de latencia (OD_{540}), velocidad específica máxima de crecimiento (μ_{\max}) para cada una de las cepas y porcentaje total de reducción de la DQO.

3.10.3.3 Diseño de experimentos y análisis estadísticos para la los tratamientos a 0 g/L de las cepas microbianas: El diseño de experimentos para la evaluación del tratamiento con o sin adaptar las cepas en 0 g/L cuenta con dos factores: adaptación o no adaptación y cepas (1, 3, 4 y 7) y las variables de respuesta fueron: concentración de biomasa una vez las cepas alcanzan la fase de latencia (OD_{540}), velocidad específica máxima de crecimiento ($\mu_{m\acute{a}x}$) para cada una de las cepas y porcentaje total de reducción de la DQO. Para el análisis estadístico se hizo un análisis multifactorial ANOVA con un nivel de confianza del 95%, el cual sirve para comparar si los valores de velocidad específica máxima de crecimiento ($\mu_{m\acute{a}x}$), crecimiento de biomasa (OD_{540}) y porcentaje de reducción de DQO obtenidos al variar las cepas y el hecho de que sean o no adaptadas, son similares o significativamente diferentes.

3.11 DETERMINACIÓN DE INHIBICIÓN ENTRE CEPAS

Una vez seleccionadas las cepas microbianas se evaluó la inhibición bacterial entre cepas según la metodología propuesta por Lord, 2002 con el fin de seleccionar un posible consorcio nativo. El medio de cultivo utilizado fue Agar Nutritivo, este fue servido en cajas Petri y se dejó secar incubándose a 30°C durante 30 minutos. Adicionalmente se prepararon diluciones seriadas (10^0 - 10^{-5}) de las cepas microbianas; para la dilución inicial 10^0 se tomaron 3 asadas de las cepas de trabajo con un asa de nichrome (a cada cepa se le realizó el tratamiento por separado) y se introdujeron en un eppendorf con 1 mL de agua estéril, se agitó en el vortex durante 30 segundos y a partir de ésta se prepararon las demás diluciones como se indicó en la parte de diluciones seriadas (numeral 3.7.1). Posteriormente se sembraron 100 μ L de las diluciones 10^0 , 10^{-3} , 10^{-5} en superficie, en el Agar empleando un asa de vidrio. Por otro lado se cortaron discos de papel filtro de 6 mm de diámetro esterilizados

previamente en autoclave a 121⁰C y 15 psig por un período de 15 minutos. Estos filtros se introdujeron dentro diferentes diluciones seriadas (10⁰,10⁻¹,10⁻³,10⁻⁵) y se agitaron por 30 seg. Una vez impregnados con la solución bacteriana se colocaron 4 discos por caja Petri, sobre la superficie del agar, empleando una pinza estéril, con una distancia suficiente entre ellos para evitar la superposición de los halos de inhibición en caso que los halla. Cada tratamiento se hizo por duplicado con cada una de las combinaciones evaluadas. Finalmente, una vez dispuestos los discos sobre el agar se dejan secar durante 30 minutos para luego llevarlos a incubar a 30⁰C durante un periodo de 24-48 horas.

En caso de presencia de inhibición entre una cepa y otra se espera la aparición de unos halos de no crecimiento de la cepa sembrada en la caja. Para este caso se tomó en cuenta sólo su presencia o su ausencia, ya que el análisis se realiza de forma cualitativa y no se pretende determinar el nivel de inhibición (Lord, 2002).

3.12 CINÉTICAS DE CRECIMIENTO Y DEGRADACION CON CONSORCIOS MICROBIANOS

3.12.1 Consorcio comercial: Para estas pruebas se emplea un consorcio de microorganismos eficiente fabricado por Orius Biotecnología. Su composición se presenta en la tabla 8. Este se activa antes de ser inoculado al agua residual. La activación se hace en 50 mL de caldo Nutritivo previamente esterizados. Se inocularon 500 µL del consorcio y se dejó incubando por 24 horas en el shaker a 150 rpm.

Tabla 8. Composición del Consorcio Comercial Bacthons® SC (Orius, Biotecnología)

Cepa	UFC*/ml
<i>Azospirillum brasilense</i>	cuarenta millones
<i>Azotobacter chroococcum</i>	treinta millones
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	cien millones
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	cien millones

Ingredientes aditivos: c.s.p. 1 Litro

*UFC: Unidades Formadoras de Colonia

La inoculación del agua residual y la toma de muestras se hacen de la misma forma indicada en el numeral 3.10.1., en el proceso de tratamiento biológico con el consorcio no se utiliza caldo nutritivo, sólo el agua de tratamiento.

3.12.2 Consorcio nativo: Para estas pruebas se combinaron las cepas que no presentaron inhibición en las pruebas antes descritas en el numeral 3.11. Inicialmente se prepararon los preinóculos de cada una de las cepas por separado como se indica en el numeral 3.10.1.

Para inocular el agua residual se tomaron los dos preinóculos por separado y se les ajustó la OD₅₄₀ de la forma en que se indicó en la adaptación de las cepas microbianas (numeral 3.10.3). Sin embargo, el preinóculo estaba constituido por 10 mL de cada una de las cepas bacterianas. Para esta fermentación también se tomaron muestras cada dos horas con el fin de hacer un seguimiento a la biomasa y determinar la reducción total de la DQO. Para la toma de las muestras y las mediciones se sigue el mismo procedimiento descrito previamente en el numeral 3.10.

3.12.3. Diseño de experimentos y análisis estadísticos para la determinación del mejor tratamiento (tratamiento con consorcio nativo, consorcio comercial o cepa individual): Para las cinéticas de

cada uno de los consorcios y para la cepa individual se desarrolló un diseño de experimentos con un factor: consorcio o cepa nativa y con 3 variables de respuesta: μ_{\max} , densidad óptica y % reducción de DQO. Se trabajó con un análisis unifactorial ANOVA con un nivel de confianza del 95%, el cual sirve para comparar si los valores de velocidad específica máxima de crecimiento (μ_{\max}), crecimiento de biomasa (OD₅₄₀) y de porcentaje de reducción de DQO obtenidos al variar las cepas, son similares o significativamente diferentes.

El factor de estudio estuvo constituido por los consorcios y la cepa evaluada (consorcios nativos; 1,4 y 1, 4, 7; consorcio comercial y cepa 7). Todos se evaluaron al ser sembrados en 0 g/L de caldo nutritivo.

3.13 DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS

3.13.1 Determinación de la velocidad específica de crecimiento:

Para determinar la cinética de crecimiento de las cepas se ajustó el crecimiento microbiano a un modelo exponencial (Doran 2006; Llano, 2007)

Ecuación 10 (Llano, 2007; Doran, 1996)

Donde:

μ_{\max} = velocidad específica máxima de crecimiento, h⁻¹

X = concentración celular, medida como la OD₅₄₀ (t)

X₀ = concentración celular en el tiempo cero, OD₅₄₀ (t₀)

t= tiempo (h^{-1})

La linearización del modelo exponencial genera la ecuación 10, donde la pendiente de la grafica Ln X vs t es u_{max} .

Ecuación 11 (Llano, 2007; Doran, 1996).

3.14 ELABORACIÓN DE EVALUACIÓN ECONÓMICA DEL TRATAMIENTO BIOLÓGICO Y EL PROCESO ACTUAL.

Para la evaluación económica se determinaron los costos operacionales, el capital de trabajo del proyecto, los ingresos diferidos, los ingresos, los gastos preoperativos y demás rubros necesarios para el flujo de efectivo de cada tratamiento. Se determinaron los costos operacionales con los costos directos e indirectos y con esto se realizó un flujo de efectivo a 5 años incluyendo depreciaciones, amortizaciones, capital de trabajo, una inflación de 4.5% anual y un aumento de costos del sector de 5%.

Para cada caso se hizo un análisis de rentabilidad con TIR (Tasa Interna de Retorno), Relación beneficio-costos (B/C) y valor presente neto (VPN). Estos indican la viabilidad y/o rentabilidad del proyecto.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 ENSAYOS PRELIMINARES DEL AGUA RESIDUAL

4.1.1 Ensayo de pH (buffers): El agua residual se expuso a los diferentes buffers intentando abarcar toda la escala de pH y se obtuvieron los resultados que se presentan en la tabla 9.

Tabla 9. Comportamiento de las aguas en los buffers para cambio de pH.

Buffer	pH	Resultados	Cambio de coloración
citrato	3	presencia de precipitado	Si
fosfato	5	presencia de precipitado	Si
fosfato	6	ninguna	No
fosfato	7	ninguna	No
borato	9	ninguna	No
borato	10	ninguna	No

Se puede observar que a pH's bajos (buffers 3 y 5) se presentan precipitados blancos. Estos precipitados de alguna forma influyen en la coloración que toma

el agua, pues esta cambia de color de forma evidente. A pH's altos (básicos) no se presentan precipitados ni cambios de color evidentes y por tanto se puede decir que los compuestos presentes en el agua se ven afectados por los pH's ácidos y no se afectan por medios básicos. Por esto se decide trabajar las cinéticas a pH superiores de 6.0. Se encontró que los precipitados producidos generan interferencia en las mediciones espectrofotométricas y por tanto se prefiere evitar zonas de la escala de pH donde se encuentren estas precipitaciones, pues las posteriores mediciones producirían resultados erróneos.

Es probable que los precipitados sean una mezcla de sales formadas tras la reacción de CO₂ con ácido carbónico y hidróxidos en el medio, esto en condiciones básicas como las encontradas en el transcurso del proceso, esto se concluyó tras una serie de análisis de laboratorio efectuados en la Planta. Las especies encontradas (Rodríguez, 1986; Milovski, 1982).

4.1.2. Esterilización del agua residual

Los ensayos de esterilización (tabla 10) permitieron seleccionar el método de esterilización adecuado para el tratamiento biológico con los microorganismos nativos. Se seleccionó la esterilización con calor debido a que los otros métodos utilizados presentaron contaminación.

El empleo de la técnica de filtración por membranas de 0.45 y 0.25 micras permite corroborar que los microorganismos trabajados son probablemente bacterias, pues los únicos microorganismos (a excepción de los virus) que lograrían pasar por los tamaños de poro utilizados son las bacterias (Coto, 2000). Estas presentan, según datos encontrados en la literaturas, células con diámetros entre 0.5-0.2 micras, además se encontró que, en medios con bajas

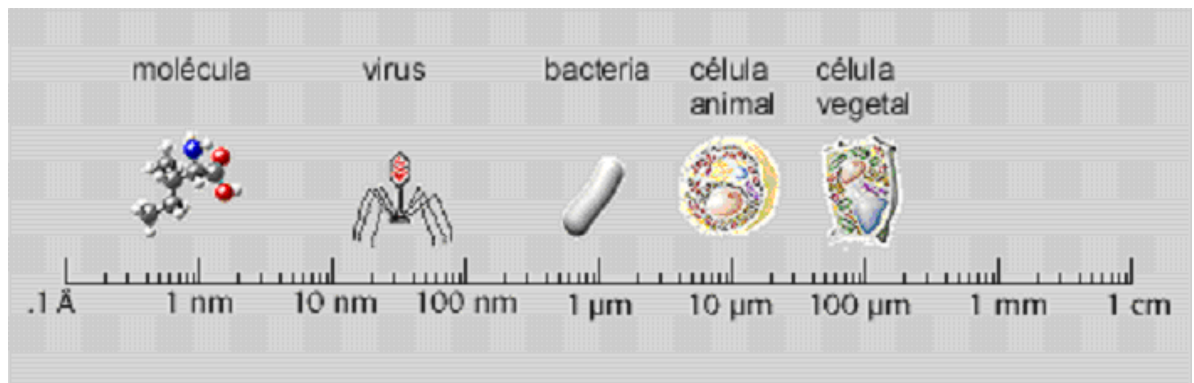
fuentes de carbono, como el empleado en este trabajo, las bacteria tienden a disminuir su tamaño de diámetro y variar su forma celular. Especificamente para bacterias como las *Pseudomonas*, *Eschericha coli* y bacterias vibrio marinas se ha encontrado que las células cambian su forma, estas pasan de ser un bastones a ser unas pequeñas esferas. (Koch, 2001; Coto, 2000 y Givskov, 1994).

Tabla 10. Ensayos de esterilización efectuados y sus resultados.

Sistema de esterilización	Descripción	Resultados	Observaciones
Luz Ultravioleta	Exposición a 295 nm.	Contaminación	Crecimiento bacteriano
Filtros de membrana	Filtros cualitativos	Contaminación	Crecimiento bacteriano y levaduras
	Filtros 0,45 micras	Contaminación	Crecimiento bacteriano
	Filtros 0,25 micras	Contaminación	Crecimiento bacteriano
Por calor	Exposición a vapor a 121°C y 15 psig	No contaminación	No crecimiento

El tamaño de los microorganismos puede verse en la Figura 3. Se puede apreciar que las bacterias tienen tamaños del orden de 100 nm. a 1 micra, los virus por su parte son mas pequeños que las bacterias y las células animales y vegetales son mucho mayores a 1 micra.

Fig. 3 Tamaño de los microorganismos (Coto, 2000).



El método de esterilización por calor puede presentar algunos inconvenientes, ya que, al aplicar calor al agua residual se corre el riesgo de volatilizar los COV (Compuestos Orgánicos Volátiles), en caso de haberlos o de desnaturalizar los compuestos termolábiles. Esto podría producir variaciones en la cantidad y el tipo de carga orgánica del agua residual. Por otro lado, este método no es escalable a nivel industrial, ya que de hacerlo sería poco viable económicamente, así que los resultados logrados se alejarían de aquello posiblemente obtenido a una escala mayor. Sin embargo, este método se emplea para mantener monitoreo sobre el efecto de la cepa que se está estudiando y evitar posibles sinergias o inhibiciones de otras cepas presentes en el agua. En el caso del tratamiento en la planta esto no se haría necesario y se realizarían pruebas posteriores con el agua sin esterilizar.

El proceso de esterilización con luz ultravioleta no fue exitoso posiblemente debido a que se requiere mayor tiempo de contacto de las aguas a la longitud de onda utilizada (295 nm.) o una longitud de onda diferente. Respecto al tiempo de exposición, se considera poco viable aumentarlo por costos como debido a que

se tendría un cuello de botella en el proceso (en este caso se puso en contacto el agua con la luz u.v. durante 24 horas, y este tiempo es muy alto en relación a los tiempos utilizados en todo el tratamiento biológico).

En cuanto a la posible variación de la longitud de onda, se pudo encontrar que Guimaraes et.al., 2000 lograron descontaminar aguas con luz U.V. exponiéndolas a longitudes de onda entre 300 y 400 nm.; por tanto, la variación de la longitud de onda puede ayudar en la desinfección. En este trabajo se utilizó una longitud de onda de 295 nm., pues esta es la longitud de onda de las lámparas u.v. del Laboratorio de Biotecnología donde se realizaron los ensayos.

Es posible además, que los compuestos presentes en el agua, tras el contacto con 295 nm. comiencen a formar intermedios y la calidad de las aguas varíe, esto sucede por ejemplo en procesos como la fotocatalisis, en el cual, los compuestos iniciales varían en el tiempo tras una exposición a una longitud de onda determinada (Guimaraes et.al, 2000).

4.2 AISLAMIENTO DE CEPAS MICROBIANAS

Los resultados obtenidos del aislamiento de las cepas a partir de las diferentes diluciones de agua residual sembradas en agar nutritivo se presentan a continuación en la tabla 11, en esta se expresa el tipo de crecimiento obtenido (abundante o aislado), las diluciones realizadas (10^0 - 10^{-6}) y se describe la morfología observada de las cepas. Se presentan los resultados de los controles de cámara (caja Petri con medio expuesta al ambiente de la cámara) y control de medio (caja Petri con medio sin abrir).

Tabla 11. Resultados de seguimiento para el aislamiento*

Dilución	Microorganismo	Morfología
10 ⁰	+++	Mezcla de colonias redondas y masa blanca
10 ⁻¹	+++	Mezcla de colonias redondas y masa blanca
10 ⁻²	+++	Colonias blancas y amarillas redondas y masa blanca
10 ⁻³	++	Colonias blancas y amarillas y masa blanca
10 ⁻⁴	++	Colonias blancas y amarillas y masa blanca
10 ⁻⁵	++	Colonias blancas y amarillas redondas
10 ⁻⁶	+	Colonias blancas y amarillas redondas
Control medio	-	_____
Control cámara	-	_____

* +++ Crecimiento abundante, ++ crecimiento aislado, + aislamiento, - sin crecimiento

Tras el proceso de aislamiento se obtuvo el crecimiento microbiano en las diferentes diluciones de la serie. La morfología de las colonias es similar aunque presentan divergencias apreciables en color, forma, diámetro y textura de la superficie (Tablas 11 y 12) que permiten diferenciar una colonia de otra; se encontró que en general las colonias son redondas y blancas o amarillas, aunque en las primeras diluciones se encuentra una masa blanca y/o amarilla debido a la superposición de colonias y su gran esparcimiento en la caja Petri, pero esta masa va desapareciendo al aumentar las diluciones y comienzan a aislarse en colonias separadas. Así en la dilución 10⁻⁶ se pueden apreciar las diferentes colonias separadas y de fácil acceso para el aislamiento.

De las cajas Petri correspondientes a las diluciones finales se extrajeron aquellas colonias aisladas, sin contacto con ninguna otra y se pasaron a un nuevo medio sólido por el método francés (Tabla 12).

Tabla 12. Cepas aisladas en el proceso.

Cepa	Forma	Superficie	Color	Diámetro (mm)	Otros
Cepa 1	Redonda	Lisa	Amarillo	3-4	Crecimiento separado.
Cepa 2	Redonda	Lisa	Blanca	1-2	Crecimiento separado.
Cepa 3	Redonda	Rugosa	Blanca	3-4	Crecimiento separado.
Cepa 4	Redonda	Lisa	Amarillo	3-4	Crecimiento aglomerado
Cepa 5	Masa	Lisa	Blanca		Crecimiento aglomerado
Cepa 6	Redonda	Lisa	Blanca	5-6	Crecimiento desordenado
Cepa 7	Masa	Lisa	Blanca	3-4	Crecimiento aglomerado

A partir del agua residual se obtuvieron 7 cepas las cuales fueron nombradas con números del 1 al 7 arbitrariamente con el fin de ser identificadas. Las colonias se diferenciaron unas de otras gracias a sus divergencias cualitativas; el color entre las colonias varía, la forma de crecimiento también y la textura en la superficie de las colonias es diferente, así mientras casi todas las colonias son lisas, una de ellas es rugosa y permite diferenciación (Tabla 12)

Las cepas que se obtuvieron del proceso de aislamiento de las aguas residuales estudiadas son pocas y sin muchas variaciones entre ellas (comparando con otros aislamientos), pues se pudo encontrar en varias fuentes que en los aislamientos se pueden obtener hasta 45 cepas (Basu *et al.*, 1996).

Adicionalmente se pudo apreciar que los controles no presentaron crecimiento, por lo tanto las cajas no se consideran contaminadas y se espera que todas las cepas obtenidas provengan del agua; esto se cumple tanto para la primera como para la segunda fase del aislamiento.

Tras el aislamiento de las colonias obtenidas en la dilución 10^{-6} se tomaron asadas de cada colonia y se llevaron a diferentes medios de cultivo para evidenciar su crecimiento en los medios selectivos (Tabla 13) y de esta manera poder determinar qué tipo de microorganismo se obtuvieron.

Tabla 13. Crecimiento de las cepas en los agares selectivos

Cepa	Agar nutritivo	Agar Cetrymide	Agar Sabouraud	Agar Ogy
1	X	X	X	X
2	X		X	X
3	X	X		X
4	X			X
5	X			
6	X	X	X	X
7	X	X	X	X

Los resultados obtenidos a partir del empleo de los medios selectivos no fueron muy útiles para la caracterización de las cepas ya que estas presentaron crecimiento indistinto en diferentes medios. Por ejemplo, para el caso de la cepa 2, podría tratarse de una levadura, un hongo o una bacteria ya que presenta un buen crecimiento en los medios agar nutritivo, agar saburaud y agar ogy; lo único que puede asegurarse es que no se trata de una *Pseudomona aeruginosa*, ya que no creció en agar cetrymide. En este agar se inhiben la mayoría de las especies que no son pseudomonas, sin embargo algunas pseudomonas también son inhibidas. (Merck, 2003). Era de esperarse que todas las cepas crecieran en agar nutritivo, pues este medio por ser tan rico en nutrientes permite el crecimiento de casi la totalidad de microorganismos.

Adicionalmente se realizó la tinción de Gram de las diferentes cepas aisladas, logrando definir las como bacterias Gram negativas con diferentes morfologías (Tabla 14).

Tabla 14. Resultado tinción de Gram

Cepa	Microorganismo	Tinción	Morfología
1	Bacteria	Gram negativa	Bacilo
2	Bacteria	Gram negativa	Bacilo
3	Bacteria	Gram negativa	Bacilo Grande
4	Bacteria	Gram negativa	Bacilo
5	Bacteria	Gram negativa	Bacilo
6	Bacteria	Gram negativa	Bacilo
7	Bacteria	Gram negativa	Coco-bacilo

Partiendo de la morfología de las células observadas en el microscopio y de los resultados obtenidos en la tinción de Gram pudo asegurarse que las 7 cepas son bacterianas, 6 bacilos del tipo Gram negativo y un coco-bacilo igualmente gram negativo. Así que, el aislamiento de las diferentes cepas presentes en el agua residual evidenció crecimiento bacteriano y no fúngico. La temperatura de incubación se mantuvo entre 30 °C y 32 °C. De esta manera las bacterias que se evidenciaron por su crecimiento en el medio son bacterias mesofílicas.

4.3 CURVAS DE CRECIMIENTO

Para cada una de las cepas se realizó la curva de crecimiento densidad óptica vs. peso seco, esto con el fin de correlacionar una medida de crecimiento indirecta como es la densidad óptica con una variable directa como es el peso seco, las ecuaciones de las curvas de calibración se presentan en la tabla 15.

Tabla 15. Ecuaciones y correlaciones de las curvas de crecimiento de las cepas y consorcio comercial Bacthon SC.

Cepa	Ecuación	R ²
1	Y=1.1021X	0.9395
3	Y=2.8688X	0.9227
4	Y=1.5271X	0.8868
7	Y=1.1176X	0.9084
Consortio comercial	Y=0.9374X	0.9403

Se encontraron relaciones directamente proporcionales y lineales entre el peso seco y la densidad óptica para cada una de las cepas dentro de un rango de absorbancias, sin desviarse de la ley de Beer-Lambert, esto con un buen factor de correlación tendiente a 0,9 lo cual significa que existe una relación directa entre la absorbancia y el peso seco. Esta ley se limita para valores de densidad óptica (OD) inferiores o cercanas a la unidad, ya que a valores muy superiores a la unidad la tendencia lineal comienza a desviarse (Becker, *et al.*, 1996).

4.4 SELECCIÓN DE CEPAS MICROBIANAS

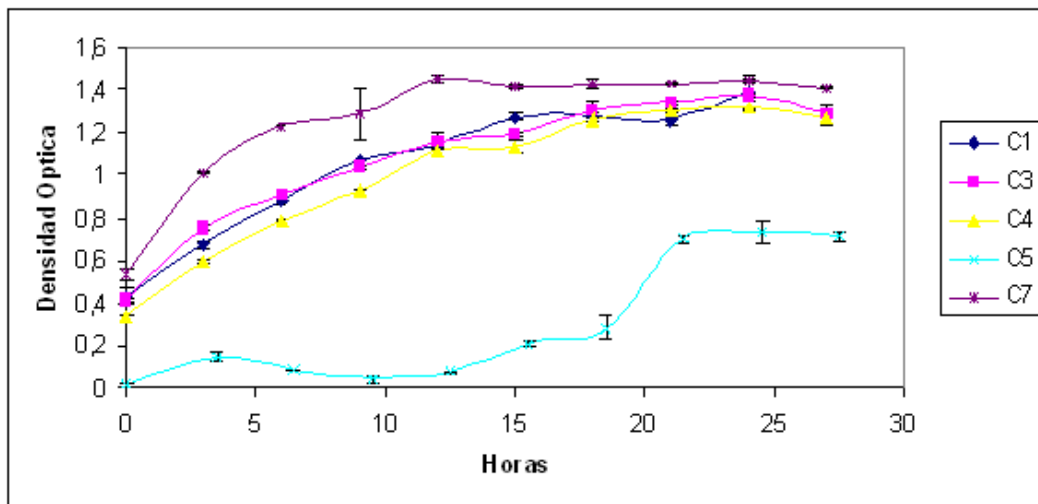
La selección de las cepas de trabajo se realizó con base en la capacidad de la cepa para crecer en el agua problema y de reducir la DQO. Se trabajó con las cepas aisladas 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 y se seleccionaron las cepas viables para el tratamiento biológico.

4.4.1 Análisis de la formación de biomasa y velocidad específica de crecimiento en los ensayos preliminares de selección de cepas:

Las cinéticas de crecimiento y sus velocidades específicas máximas de crecimiento se presentan en la gráficas 1 y 2 respectivamente. Estos ensayos se realizaron dos veces por separado y se encontró reproducibilidad entre ellos.

Los resultados de las cepas 2 y 6 no se incluyen ya que sus preinóculos no presentaron ningún crecimiento en caldo nutritivo, procedimiento repetido en dos ocasiones con igual resultado. Adicionalmente se inocularon estas dos cepas en el agua de tratamiento y tampoco se logró crecimiento. Por esta razón las cepas 2 y 6 se descartaron del proceso. La selección de cepas se realizó únicamente con las cepas 1, 3, 4, 5 y 7.

Grafica 1. Cinética de crecimiento de las cepas aisladas del agua residual

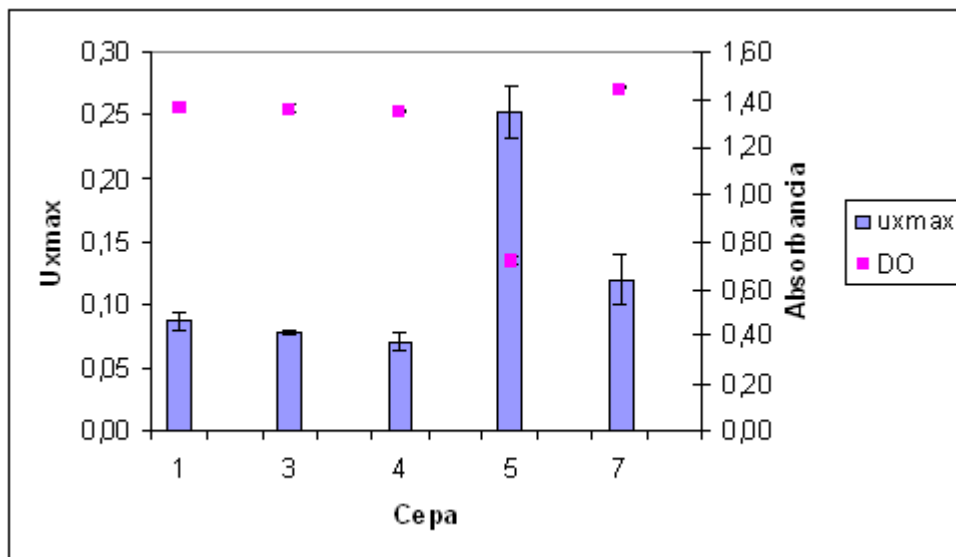


*Barras verticales: error estándar

En la grafica 1 puede observarse que las cepas 1, 3, 4, 5 y 7 presentaron crecimiento con base en medio de agua residual, por lo cual se consideraron como viables. Las cinéticas de crecimiento de las cepas son muy similares entre sí, excepto para la cepa 5, cuyo comportamiento se desvió del común.

En las cinéticas no se aprecia la presencia de fase lag, lo cual indica que el tiempo de preinoculación de las cepas fue adecuado, esto con excepción de la cepa 5 que fue la única en presentar esta fase y cuya duración fue de 10 horas seguida por la fase exponencial de 9 horas. Las fases exponenciales de las demás cepas tuvieron una duración de 12 horas aproximadamente. Después del crecimiento exponencial siguió una fase estacionaria en la cual no hubo aumento en la densidad óptica.

Gráfica 2. Velocidades específicas de crecimiento y densidad óptica a las 22 horas para las cepas aisladas del agua residual.



El valor P correspondiente al análisis de varianza para el factor cepa y la variable dependiente OD fue de 0.0018. Como este valor es menor que el valor de significancia ($= 0.05$) se puede decir que las diferentes cepas presentan una diferencia estadísticamente significativa en cuanto a la formación de biomasa (anexo V).

Al realizar un análisis de rangos múltiples (anexo V) se encontró que la cepa 5 presenta diferencias significativas con las cepas 1, 3, 4 y 7 con respecto a la DO

de la biomasa, pero estas últimas no presentan diferencias significativas entre sí. Esto se confirma en la gráfica 1, en la cual puede verse similitud entre las cinéticas de las cepas 1, 3, 4 y 7 y las diferencias de estas con la cinética de la cepa 5. La OD_{540} para la cepa 5 en la fase estacionaria fue la menor: 0,69, y para las cepas 1, 3, 4 y 7 fue de 1.22, 1.38, 1.39, 1.43 respectivamente, siendo mayor la de la cepa 7.

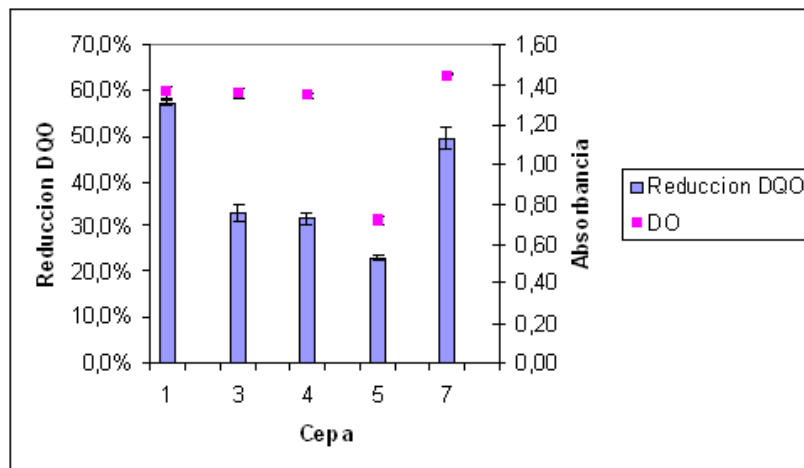
Se encontró, con respecto a la velocidad específica de crecimiento (h^{-1}) (ver gráfica 2) que existen diferencias significativas entre las cepas (anexo V). El valor P para el análisis del factor cepa y variable dependiente μ_{max} es de 0.001, menor que el valor de significancia (= 0.05).

De acuerdo con los resultados (anexo V) la velocidad es significativamente mayor para la cepa 5 con un valor promedio de $0,25h^{-1}$ a pesar de ser la cepa con menor formación de biomasa. La menor velocidad se encontró que corresponde a las cepas 1, 3 y 4, con valores de 0.088, 0.077, 0.071 h^{-1} respectivamente; entre éstas no se presentaron diferencias significativas. El estudio presentó un comportamiento homogéneo entre las cepas 1-3, 1-4, 1-7, 3-4 y 3-7 y se presentan diferencias significativas entre las cepas 1-5, 3-5, 4-5, 4-7 y 4-5.

4.4.2 Análisis de la reducción de DQO en los ensayos preliminares de selección de cepas:

A cada una de las cepas consideradas como viables también se les determinó la capacidad de reducción de la carga orgánica presente en el agua (grafica 3

Grafica 3. Reducción porcentual de la DQO y densidad óptica a las 22 horas para las cepas aisladas del agua residual.



Entre las cepas viables también se encontró que existen diferencias significativas en cuanto a la reducción de la DQO. El valor P para el análisis del factor cepa y la variable dependiente reducción de la DQO fue de 0.0011, como este valor fue menor que el valor de significancia (= 0.05) se puede decir que las diferentes cepas presentaron una diferencia estadísticamente significativa en su capacidad de reducción de la DQO.

Según el análisis de rangos múltiples, el estudio presentó un comportamiento homogéneo entre las cepas 1-7,3-4 y 4-5, y que se presentaron diferencias significativas entre las cepas 1-3, 1-4, 1-5, 3-5, 3-7, 4-7 y 5-7. Las mayores reducciones obtenidas fueron del 57,3% correspondiente a la cepa 1 y del 49,9% correspondiente a la cepa 7. La cepa 3 y la cepa 4 presentaron reducciones intermedias y la menor reducción correspondió a la cepa 5 con un valor de 23,35%. De esta manera, a pesar de ser esta la cepa que presentara

una mayor velocidad específica máxima de crecimiento no fue la de más potencial para degradar la fuente de carbono del medio. De esto podría afirmarse que, la reducción no es dependiente de la velocidad específica máxima de crecimiento.

Por otro lado se percibe una correlación directa de la formación de biomasa (DO) con la DQO. Las cepas que presentaron una mayor densidad óptica, presentaron una mayor reducción de carga orgánica, como es el caso de las cepas 1 y 7, mientras que la cepa 5 que fue la de menor reducción, coincidió con la de menor formación de biomasa.

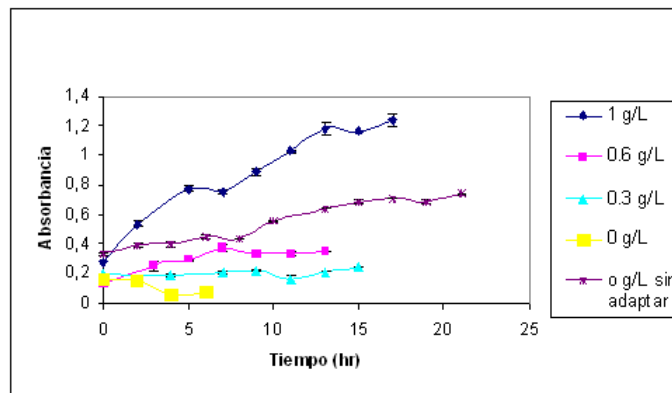
De estos ensayos se decide descartar la cepa 5, pues a pesar de ser la cepa con mayor velocidad específica máxima de crecimiento es también la cepa con la menor reducción de la DQO y la menor formación de biomasa. Posiblemente, esto indica que dicha cepa no asimila correctamente la fuente de carbono presente en el agua residual, es decir no posee la capacidad para degradar los contaminantes. Por otro lado, vale recordar la presencia de una fase lag prolongada para esta misma cepa, lo que dificulta su adaptación en el agua y además da constancia de la insuficiencia del tiempo empleado en la incubación del preinóculo. Todo ello generaría inconvenientes a la hora de llevar el tratamiento a escala industrial lo cual aumentaría los costos del proceso.

4.5 ADAPTACIONES DE LAS CEPAS

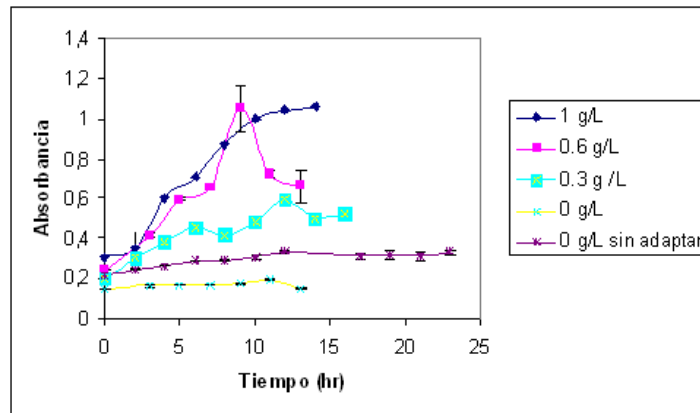
4.5.1 Análisis de biomasa para las cepas en las adaptaciones: En el proceso de adaptación de los microorganismos se realizaron las cinéticas de

crecimiento para las cepas seleccionadas (cepas 1, 3, 4, 7) en los diferentes medios de cultivos a base de agua residual con concentraciones decrecientes de caldo nutritivo (1, 0.6, 0.3, 0 g caldo/L agua residual). Estos ensayos se realizaron dos veces por separado hallando reproducibilidad entre ellos, y los resultados de uno de ellos se presentan en la gráficas 4, 5, 6 y 7 para las diferentes cepas microbianas. Adicionalmente, en estas gráficas se anexa la cinética de crecimiento de las cepas sin adaptar en el agua residual sin caldo nutritivo (concentración 0 g caldo/L agua residual.)

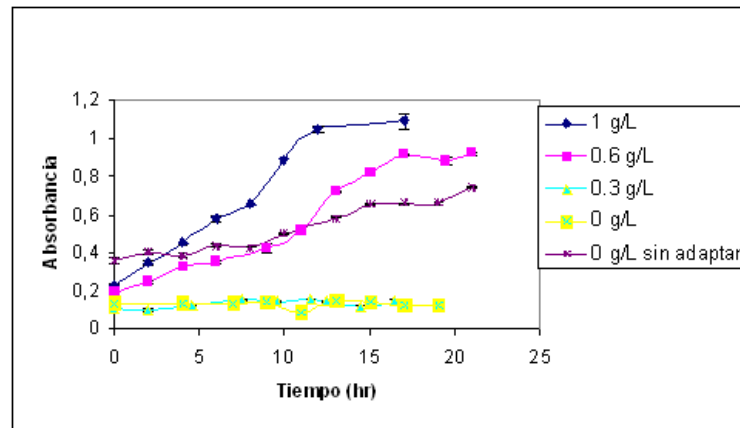
Grafica 4. Adaptación cepa 1



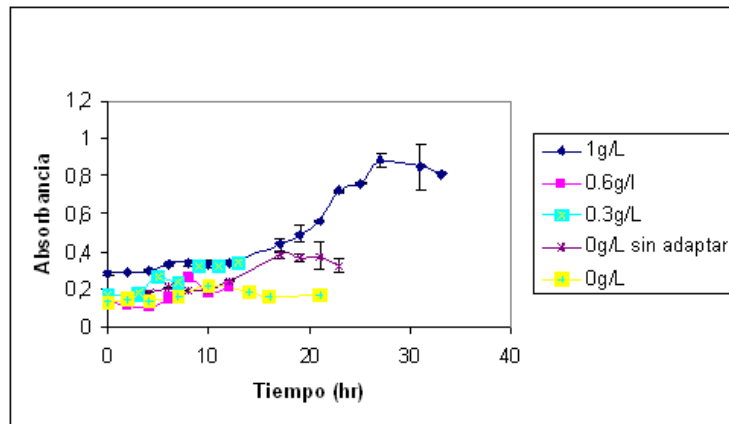
Gráfica 5. Adaptación cepa 3



Gráfica 6. Adaptación cepa 4.



Gráfica 7. Adaptación cepa 7.



A partir de las gráficas puede observarse que, para todas las cepas a pesar de que presentaron diferencias entre si, a medida que se disminuye la fuente alterna de carbono más asimilable (caldo nutritivo) tiende a disminuir la formación de biomasa de manera significativa.

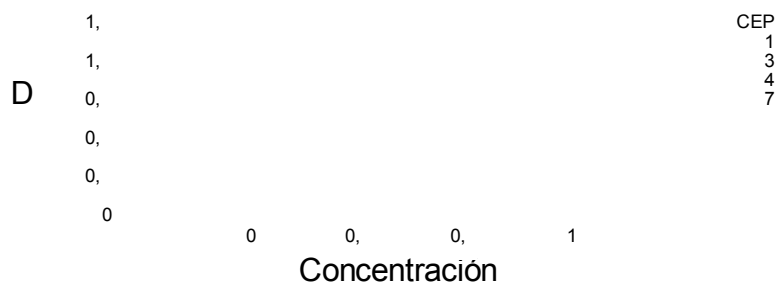
El análisis de varianza para los factores cepa y concentración de caldo nutritivo en el agua y la variable dependiente OD son de 0,00 para ambos casos (anexo VI). Por otro lado, el valor P correspondiente a la interacción entre ambos factores tomó un valor de 0,00 por esto puede afirmarse que existe una interacción entre ellos.

Para concentraciones de 1 g/L se obtuvieron densidades ópticas alrededor de 1.04, para el caso de 0.6 g/L de 0.55, para 0.3 g/L de 0.322 y para 0 g/L de 0.158; valores que corresponden al promedio de las densidades ópticas de las cuatro cepas.

La cepa 3 fue la que presentó la mayor formación de biomasa, seguida por las cepas 4, 1 y 7, esta última presentó la menor formación de biomasa.

A continuación se muestra la gráfica dada por el software STATGRAPHICS Plus 5.1, para la biomasa (DO) a las 22 horas y para las cepas adaptadas en las diferentes concentraciones de caldo nutritivo empleadas.

Gráfica 8. Interacciones de la variable dependiente densidad óptica con los factores cepas y concentración de CN



Esta disminución en la formación de la biomasa a medida que se disminuye la concentración del caldo nutritivo se deriva a la disminución de la fuente de carbono más asimilable. En el caso del agua residual con 1 g/L la fuente de carbono se presenta como moléculas de bajo tamaño en forma de peptona y extracto de carne fácilmente asimilables por el microorganismo, mientras que en el caso del agua sin caldo la fuente de carbono se encuentra como una cadena polimérica con acrilamida la cual el microorganismo debe romper antes de acceder a ella, haciendo más difícil su asimilación. La fórmula molecular de los polímeros floculantes utilizados (poliacrilamida aniónica o catiónica) es compleja y el acceso al carbono presente se hace mas difícil por la conformación y configuración del polímero. Los pesos moleculares van de 1'000.000 a 20'000.000 umas (unidades de masa atómica), lo que dificulta su

descomposición a fuentes de carbono simples (Consuegra, 2003). Elshafie *et al.*, 2007 encontraron que existen diferencias significativas en cuanto a la formación de biomasa entre fuentes de carbono con diferente número de átomos de carbono, así la variación del peso del polímero varía también el crecimiento celular producido.

Por otro lado, Se encontró que la formación de biomasa es significativamente superior para aquellas cepas que no fueron sometidas a la adaptación. El valor P del análisis de varianza para el factor adaptación con la variable dependiente OD fue de 0.0004, (anexo VI). En algunas cepas, inclusive, se presentó más formación de biomasa con la cepa sin adaptar en el medio sin caldo que las cepas sometidas al proceso de adaptación en los medios con 0.6 y 0.3 g/L de C.N. Con respecto a la formación de biomasa es mejor el escenario presentado por las cepas sin adaptación. Contrario a lo encontrado en la literatura en donde se reportan procesos de adaptación con impacto positivo para la capacidad biodegradativa del microorganismo (Mehmetoglu *et al.*, 2003).

Se espera que la exposición prolongada del microorganismo al medio adverso le permita evolucionar de tal manera que su metabolismo sea capaz de producir ciertas enzimas aptas para actuar sobre la fuente de carbono difícil de asimilar presentes en el medio adverso (Carrillo *et al.*, 2004) ya que las cepas que se emplearon para la biodegradación fueron inicialmente aisladas del agua residual se supone que estas ya posean un metabolismo que les permita sobrevivir en esta agua. El hecho de agregar una fuente alterna de carbono más asimilable generaría una variación en sus rutas metabólicas las cuales tendrían que evolucionar nuevamente para poder utilizar la fuente de carbono más compleja presente en el agua residual.

Por otro lado, el valor P correspondiente a la interacción entre ambos factores tomó un valor de 0,00, así que puede afirmarse que existe una interacción significativa entre estos.

Con respecto a las cepas evaluadas también se encontraron diferencias significativas entre una y otra en cuanto a la formación de biomasa. El valor P del análisis de varianza para el factor adaptación con la variable dependiente OD fue de 0.00 (anexo VI). Las cepas 4 y 1 presentaron, en general, la mayor formación de biomasa con un comportamiento homogéneo, mientras que las cepas 3 y 7 presentaron la menor formación.

Entre los grupos homogéneos de cepas 4-1 y 7-3 si se presentaron diferencias significativas. A continuación se muestra la gráfica 9 dada por el software STATGRAPHICS Plus 5.1, para la biomasa (DO) para las cepas adaptadas y sin adaptar.

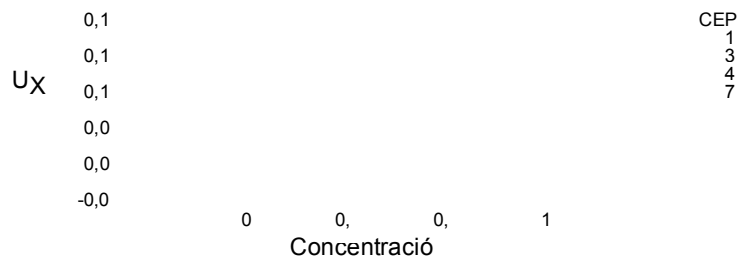
Gráfica 9. Interacción de la variable dependiente DO con los factores cepas y tratamiento de adaptación



4.5.2 Análisis de la velocidad específica máxima de crecimiento para las cepas en las adaptaciones: Con el fin de determinar el efecto de

la presencia de una fuente de carbono alterna fácilmente asimilable (caldo nutritivo) que varía su concentración en forma decreciente sobre la velocidad específica máxima de crecimiento, se graficaron los $\mu_{x\max}$ correspondientes a cada concentración de caldo nutritivo para cada cepa, los resultados se muestran en la grafica 10.

Grafica 10. Interacciones de la variable dependiente velocidad específica de crecimiento ($\mu_{x\max}$) con los factores concentración de CN y cepas



Se encontró que existe una interacción significativa entre el factor cepa y el factor concentración de caldo nutritivo en el medio. Además que cada uno de estos factores por separado afecta significativamente la velocidad específica máxima de crecimiento. Los valores P correspondientes al análisis de varianza para los factores cepa y concentración de caldo nutritivo en el agua y la variable dependiente $\mu_{x\max}$ es de 0,0222 y 0,00 respectivamente y el parámetro correspondiente a la interacción entre ambos factores tomó un valor de 0,0001 (anexo VI).

Con respecto a las concentraciones se encontró que en la segunda cinética de la adaptación, es decir aquella con concentración de caldo nutritivo equivalente a 0.6 g/L, se presentaron velocidades específicas máximas de crecimiento significativamente superiores para todas las cepas, con excepción de la cepa 4,

la cual presentó una mayor μ_{\max} en concentraciones de 1 g/L. La menor μ_{\max} corresponde a la cinética en la cual no se agregó caldo nutritivo (0 g/L); en algunos casos como con la cepa 1 y la cepa 4 no se presentó ningún crecimiento, todo esto se debe a la adversidad del medio. Para las concentraciones 0,3 g/L y 1 g/L se obtuvieron valores intermedios que no tienen diferencias significativas entre sí (anexo VI).

De todo esto, suponiendo que se busque una velocidad específica alta, al emplear cepas nativas con procesos de adaptación sería necesario mantener una concentración de 0,6 g/L de caldo nutritivo, ya que a partir de este valor, la disminución de μ_{\max} implica una inhibición por sustrato en el crecimiento del microorganismo, el medio es ya demasiado adverso.

En la literatura se reporta un decremento en la μ_{\max} a medida que se disminuye la fuente de carbono alterna, ya que esta se encarga de estimular al microorganismo a consumir la fuente de carbono del agua residual (Hess *et al.*, 1990.) Esto explicaría la disminución en la μ_{\max} cuando la concentración es menor a 0.6g/L. En la literatura consultada no se explica las posibles causas del decremento en la μ_{\max} cuando la fuente de carbono alterna se incrementa, es decir para el caso del medio con 1g/L de caldo nutritivo, casos similares no se han reportado. Sin embargo, se cree, este fenómeno se debe a que inicialmente el microorganismo es sometido a un estrés inicial que sufre cuando es pasado de un medio rico en nutrientes (caldo nutritivo) a un medio donde escasean (agua residual con 1 g/L de caldo nutritivo.) En este punto el microorganismo puede estar generando un mecanismo protector de defensa que le permita mantener su crecimiento en este medio, este comportamiento ha sido observado en diferentes microorganismos que han sido sometido cierto nivel de estrés

(Givskov, 1994) para cuando el microorganismo pasa al siguiente medio de adaptación ya el mecanismo está instalado en su metabolismo y es aquí donde se observa el pico en la μ_{max} (grafica 10). Una disminución progresiva ya genera demasiado estrés y el mecanismo protector no es suficiente y se genera inevitablemente una disminución en la μ_{max}

Con respecto a las cepas se encontró que las cepas 3 y 7 presentaron, en general en todo el proceso de adaptación, los mayores valores de μ_{max} (0.092, 0.086; valores promedio de las cepas en todo el proceso de adaptación), con diferencias significativas con las demás cepas pero sin diferencias entre ellas. Mientras que las cepas 4 y 1 presentaron el menor valor de μ_{max} , sin diferencias significativas entre ellas (anexo VI).

Con el fin de comparar las cepas adaptadas y sin adaptar en el agua residual se graficaron sus velocidades específicas máximas de crecimiento, para todas las cepas adaptadas y sin adaptar (gráfica 11).

Gráfica 11. Velocidades específicas máximas de crecimiento para las cepas adaptadas y sin adaptar en el agua residual



análisis de varianza para el factor adaptación (cepas con proceso de adaptación o cepas sin proceso de adaptación) con la variable dependiente μ_{\max} es de 0.1458, mayor al valor de significancia. Según este análisis estadístico podría decirse que no existen diferencias significativas entre el proceso adaptado y el proceso sin adaptar, sin embargo de la grafica 11 es evidente que si existen. Por lo cual se opta por analizar los resultados obtenidos para cada cepa por separado.

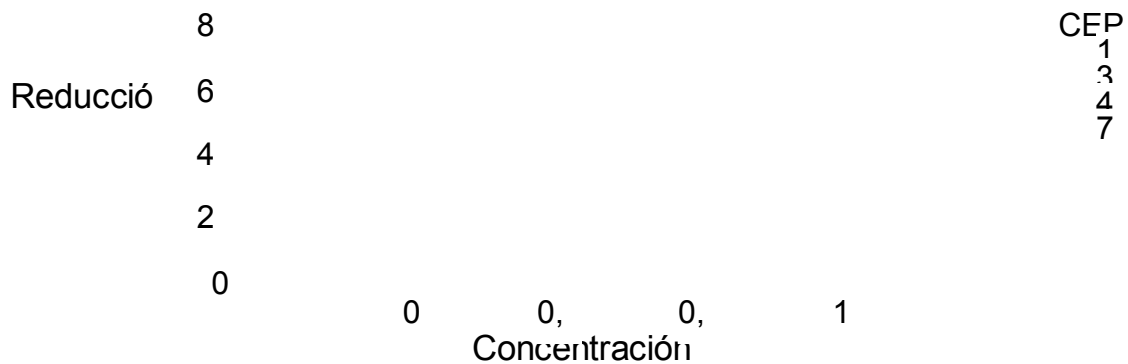
Se encontró que todas las cepas presentan un comportamiento significativamente diferente entre si. El valor P correspondiente al análisis de varianza para el factor cepa (1, 3, 4, 5, 7) con la variable dependiente μ_{\max} es de 0,0299 (anexo VI).

Para las cepas 3 y 7 se aconseja el uso del proceso de adaptación; estas presentaron mejorías en su μ_{\max} una vez adaptadas, para las cepas 1 y 4 este sería nefasto; estas ni siquiera presentan crecimiento en los procesos de adaptación. Podría decirse que existen diferencias metabólicas notables entre estos dos grupos de cepas (3-7 y 1-4). Mientras que las cepas 3 y 7 presentaron una rápida evolución en su metabolismo durante el proceso de adaptación que les permitió asimilar la fuente de carbono del agua residual, las cepas 1 y 4 no se adaptaron. Sus rutas metabólicas no se modificaron durante el tiempo que estuvieron en contacto con la fuente de carbono del agua residual tras haber estado en contacto con una fuente de carbono alterna más asimilable.

Por otro lado, el valor P correspondiente a la interacción entre ambos factores tomó un valor de 0,0009 y puede afirmarse que existe una interacción significativa entre éstos.

4.5.3 Resultados DQO: Para cada una de las cinéticas de la adaptación se evaluó la reducción de la DQO, a continuación se presentan los resultados obtenidos para cada una de las cepas en la gráfica 12.

Gráfica 12. Interacciones de la variable dependiente reducción de DQO con los factores concentración de CN y cepas adaptadas



A partir de la gráfica y del análisis estadístico (anexo VI) se observa que tanto la cepa como la concentración de caldo nutritivo en el agua residual interactúan entre sí y contribuyen significativamente en la reducción de la DQO. Además, se puede apreciar que cada uno de estos factores por separado afecta significativamente la reducción de la DQO. Los valores P correspondientes al análisis de varianza para los factores cepa y concentración de caldo nutritivo en el agua y la variable dependiente reducción de la DQO son de 0,00 para ambos casos. Por otro lado, el valor P correspondiente a la interacción entre ambos factores tomó un valor de 0,00 por lo que puede afirmarse que existe una interacción significativa entre estos.

Entre las cepas no se presentó ninguna tendencia en el rango de concentraciones evaluadas, así que se decidió analizar cada una de las cepas por separado.

Para el caso de la cepa 1 se ve una disminución progresiva en la reducción de la DQO a medida que se reduce la fuente alternativa de carbono. Para el caso de la cepa 3 sucede lo contrario, a medida que disminuye la fuente de carbono se incrementa la reducción de la DQO. Para las cepas 7 y 4, no se presentó ningún patrón, la reducción aumenta y disminuye arbitrariamente a medida que se disminuye la concentración; la reducción que presentan ambas cepas para 0 g/L y para 1 g/L son muy similares y además se aprecia una reducción mínima para la concentración 0.6 g/L

En un balance general la cepa 3 fue la que presentó el porcentaje de reducción más alto, presentando diferencias significativas con las demás cepas mientras que con las cepas 4 y 7 se alcanzó la menor; esto teniendo en cuenta las reducciones en las diferentes concentraciones evaluadas. En un balance general la cepa 3 fue la que presentó el porcentaje de reducción más alto, presentando diferencias significativas con las demás cepas mientras que con las cepas 4 y 7 se alcanzó la menor; teniendo en cuenta las reducciones en las diferentes concentraciones evaluadas.

En cuanto a las concentraciones de caldo nutritivo utilizadas, puede decirse que la menor reducción de DQO se obtuvo para 0.6 g/L, mientras que la mayor se obtuvo en las concentraciones de 1 y 0.3g/L.

Además del análisis de la influencia que presentan las cepas y las diferentes concentraciones a las diferentes variables (DQO, DO, μ_{max}) se decidió determinar si existe alguna relación entre las variables reducción de la DQO y densidad óptica en los valores obtenidos para las diferentes cepas. A continuación se muestran, en la tabla 16, las ecuaciones de las linealizaciones obtenidas al correlacionar dichas variables junto con los factores de

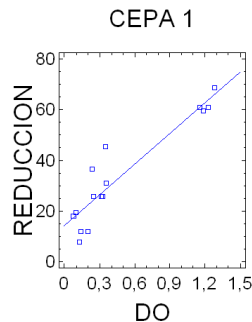
correlaciones obtenidos para cada una de las cepas. También se presenta la gráfica de reducción de la DQO vs. Densidad óptica para la cepa 1 que fue la única que mostró un factor de correlación aceptable.

Tabla 16. Linealizaciones para relaciones Reducción de la DQO vs. Densidad Óptica.

CEPA	LINEALIZACIÓN	R ²
1	Red.DQO = 14,2045+40,5799*OD	0,867907
3	Red.DQO = 59,1263 - 22,7552*OD	0,205376
4	Red.DQO = 29,2928 - 9,0215*OD	0,105932
7	Red. DQO = 13,5161 + 35,794*OD	0,403758

En la grafica 13 se muestra la Reducción de DQO vs. Densidad óptica para la cepa 1. Las gráficas de las demás cepas se muestran en el anexo VIII ya que las correlaciones obtenidas (R²) no son significativas.

Gráfica 13. Linealización Reducción DQO vs. Densidad Óptica para la cepa 1.



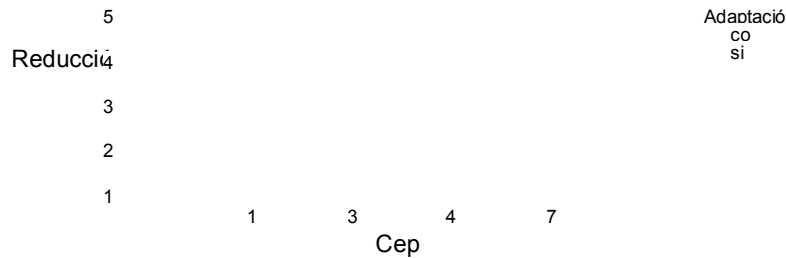
Se encontró que una mayor cantidad biomasa de la cepa 1 repercute en una mayor reducción en la DQO; por cada décima (0,1) que se incremente la Densidad óptica habrá un incremento del 4 % en la reducción de la DQO.

Como para las demás cepas el factor de correlación es muy bajo, se puede afirmar que la densidad óptica no afecta la Reducción en la DQO para las cepas 3, 4 y 7, por lo menos no bajó el modelo lineal.

La cepa 1 fue la única que presentó un comportamiento tal cual el esperado. A medida que se disminuye la fuente e carbono alterna, se logra una disminución en los nutrientes y a los microorganismos se le dificulta su consumo, al bajar el consumo se espera que la reducción de la DQO disminuya. Además, si el microorganismo no consume carbono del medio no le es posible formar mas biomasa. Es por esto, que se observa en la gráfica 12 una línea de reducción descendente y en la gráfica 13 una correlación entre la formación de biomasa y el consumo de la fuente de carbono. Las demás cepas no siguieron este comportamiento y se cree que este fenómeno puede deberse a la formación de metabolitos secundarios por parte de las demás cepas que pudieran incrementar la DQO. Además se ha encontrado que ciertos microorganismos al ser sometidos a ambientes con una escasa fuente de carbono sobreviven gracias a la capacidad de producir ciertas proteínas conocidas como proteínas de estrés (Givskov, 1994). Basándose en esto, se podría decir, que la totalidad del carbono consumido por las cepas 3, 4 y 7 no terminó únicamente en las células nuevas formadas, sino que además parte de este terminaría en nuevos productos que son medibles mediante la técnica de la DQO y que serían los responsables de este comportamiento no esperado.

Con el fin de determinar si el proceso de adaptación repercute en una mejora en la reducción en la carga orgánica del agua residual se compararon los resultados obtenidos en cuanto a la reducción de la DQO por las cepas, adaptadas y sin adaptar (gráfica 14).

Gráfica 14. Interacciones de la variable dependiente reducción de DQO con los factores cepas y proceso de adaptación



A partir de la gráfica y del análisis estadístico se observó que tanto la cepa como el tratamiento utilizado (adaptación o no adaptación) interactúan entre sí y contribuyen significativamente en la reducción de la DQO. Los valores P correspondientes al análisis de varianza para los factores cepa (1, 3, 4, 7) y adaptación (cepas adaptadas o no adaptadas) y la variable dependiente reducción de la DQO son de 0,3197 y 0,0374 respectivamente. Mientras que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las diferentes cepas adaptadas; es indiferente cuál de las cepas de trabajo se seleccione para el proceso de biodegradación con respecto a la reducción de la DQO, el hecho de si son o no sometidas a un proceso de adaptación previo si es relevante (anexo VII).

Las cepas 1, 7 y 4 no adaptadas presentan reducciones en la DQO significativamente superiores a aquellas que se presentan con las cepas adaptadas. La capacidad reductora disminuye aproximadamente en un 30, 25 y 5 % respectivamente, entre el tratamiento de las cepas adaptadas y sin adaptar. La única cepa que mostró una reducción superior en la cepa adaptada es la cepa 3.

Contrario a lo encontrado en la bibliografía, la adaptación no genera ventajas en cuanto al proceso biodegradativo. Sin embargo, Mehmetoglu *et al.*, 2003 realizó adaptaciones a diferentes concentraciones de benceno, tolueno y fenol para la biodegradación y se obtuvieron resultados positivos. Esto se debe posiblemente al empleo de medios sintéticos como fuente de carbono, en nuestro caso no se emplean estos como fuente alterna de carbono y se hace más difícil la asimilación de los mismos por las condiciones adversas en este medio y la falta de homogeneidad en el mismo.

Partiendo de estos resultados obtenidos se aconseja la selección de las cepas sin adaptar para el proceso de biodegradación con cepas nativas. A partir de los resultados obtenidos se decidió emplear las cepas sin adaptación para continuar con el estudio de los consorcios debido a que la variable de interés para este caso es la reducción de la DQO. Debido a que la cepa 3 fue la única que presentó una mayor reducción de la DQO para el microorganismo adaptado se decidió descartar esta cepa y se seleccionaron las cepas 1, 4, 7 para pasar a la otra etapa de la investigación correspondiente a la evaluación de consorcios.

4.6 INHIBICIÓN ENTRE CEPAS MICROBIANAS

La inhibición entre cepas se realizó con el fin de formular un consorcio viable para la degradación del agua residual. En la tabla 17 se presentan los resultados obtenidos para las pruebas de inhibición de las cepas seleccionadas a partir de la adaptación de cepas (1,4 y 7.)

Tabla 17. Resultados de inhibición entre cepas*.

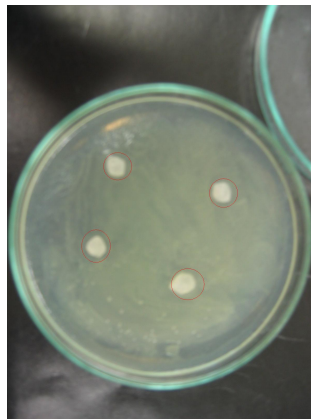
	10 ⁰	10 ¹	10 ⁻³	10 ⁻⁵
Cepa 1 en medio /cepa 4 papel				
10⁰	0/0	0/0	0/0	0/0

10⁻³	0/0	0/0	0/0	0/0
10⁻⁵	0/0	0/0	0/0	0/0
Cepa 1 en medio /Cepa 7 papel				
10⁰	0/0	0/0	0/0	0/0
10⁻³	0/0	0/X	0/0	0/0
10⁻⁵	X/X	X/X	X/X	0/0
Cepa 4 en medio /Cepa 7 papel				
10⁰	0/0	0/0	0/0	0/0
10⁻³	X/X	X/X	X/X	X/X
10⁻⁵	X/X	X/X	X/X	X/X

*0/0, X/X:: ausencia y presencia de halos de inhibición respectivamente

De la tabla 17 se puede observar que las cepas 1 y 4 son compatibles, pero las cepas 1 y 7, y 4 y 7 presentan halos de inhibición (estando la cepa 7 en el papel filtro y las cepas 1 y 4 en plateos por separado). En la figura 4 se presentan los halos de inhibición que aparecieron tras los ensayos, para mayor claridad se encerraron en círculos. Se observó que alrededor del papel filtro de 6 mm. de diámetro, no se forma biomasa, hay unos halos redondos que bordean el papel.

Fig. 4 Halos de inhibición presentados en el ensayo entre cepa 1 en plateo y cepa 7 en papel filtro.



La inhibición entre cepas puede darse por la predominancia de una cepa sobre otra debido a la presencia de metabolitos secundarios. Muchas bacterias producen antibióticos, HCN, y otras sustancias que pueden ejercer control biológico sobre otros microorganismos, además las *Pseudomonas* por ejemplo, son bacterias que logran inhibir el crecimiento de otras cepas por la producción de metabolitos que retrasan el crecimiento, es decir, es una cepa antagonista (Bashan, 2005; Costa, *et.al.*, 2006). La ausencia de halo en las pruebas de las cepas 1 y 4 permite determinar compatibilidad de estas cepas, pues su unión no inhibe, retrasa o pospone el crecimiento de una cepa sobre la otra y la presencia de halo en las siembras con cepa 7 en el papel filtro permite determinar inhibición de esta cepa con las otras y por tanto, una acción antagónica por parte de la cepa 7, es decir, la cepa 7 inhibe crecimiento para las cepas 1 y 4.

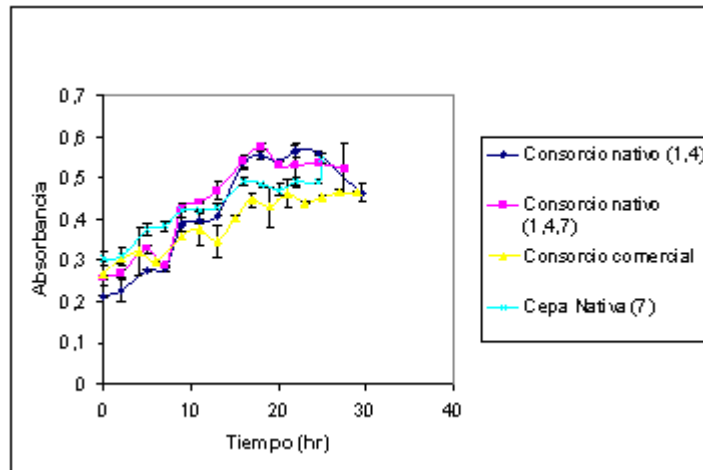
4.7 RESULTADOS DE LOS TRATAMIENTOS CON CONSORCIOS

Finalmente, una vez seleccionadas las cepas nativas más viables (cepas 1, 4, 7 sin adaptación) para el proceso de biodegradación se evaluó la posible existencia de sinergia entre estas. Para esto, se comparó el desempeño de dos consorcios compuestos por estas cepas y el desempeño de una cepa sola también sin adaptar (para estos ensayos se seleccionó la cepa 7 ya que en la gráfica 14 se observa que la cepa 7 sin adaptar presentó una mayor reducción de la DQO con respecto a las demás). Los consorcios empleados fueron el comercial (Bacton®), el consorcio 1-4, y el consorcio 1-4-7, Este último con el fin de determinar si las cepas se inhibían entre sí en medio líquido.

4.7.1 Análisis de biomasa para los consorcios y la cepa 7: Con el fin de comparar la eficiencia entre los tratamientos con consorcios nativos,

consorcio comercial y cepas individuales se realizaron cinéticas de crecimiento para cada uno de éstos (gráfica 15).

Gráfica 15. Cinéticas de crecimiento para los consorcios y la cepa 7.



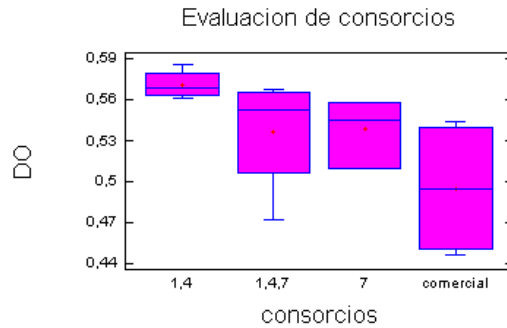
A partir de la gráfica se observa que el crecimiento de los consorcios es muy similar entre sí tanto en fases de crecimiento presentadas como en la trayectoria que sigue la cinética y que además presentan un comportamiento parecido al exhibido por la cepa individual evaluada. No hay presencia de fase lag en ninguno de los casos, las cinéticas comienzan con una fase exponencial de 18 h que es seguida por una fase estacionaria de 10 h en donde no hay crecimiento neto de los microorganismos. Las densidades ópticas alcanzadas en la fase estacionaria no presentaron diferencias significativas, fenómeno que se hace apreciable en la gráfica y que se reitera con el análisis estadístico mostrado mas adelante; lo que indicaría que no se presentó sinergia entre las cepas con respecto a la formación de biomasa.

Del consorcio comercial pondría decirse que, con respecto a la formación de biomasa, es indiferente si se emplea este o si se emplean las cepas nativas para el tratamiento en el tiempo de crecimiento evaluado. Debido a la variedad

microbiológica que presenta el consorcio comercial, es posible que el tiempo requerido de incubación para cada uno de los microorganismos presentes sea diferente y esto hace que la cinética obtenida no tenga forma definida, mientras algunos microorganismos han llegado a fase estacionario otros no lo han hecho y esto puede aportar a la irregularidad de la cinética. Por ejemplo, mientras las bacterias presentes (*Azospirillum brasilense*, *Azotobacter chroococcum* y *Lactobacillus acidophilus*) tienen cinéticas de crecimiento entre 12 y 20 horas, la *Saccharomyces cerevisiae* puede tardar hasta 72 horas para crecer, de acuerdo al medio donde se encuentre, además las fases de cada microorganismo varían de acuerdo a su metabolismo (Moreno *et.al.*, 2004). El tratamiento con el consorcio comercial se inoculó solo por 30 horas con el único fin de poder compararlo con los tratamientos en los que se emplearon cepas nativas.

El valor P correspondiente al análisis de varianza para el factor consorcio y la variable dependiente OD es de 0.0958. Como este valor es mayor que el valor de significancia (= 0.05) se puede decir que los diferentes consorcios no presentan una diferencia estadísticamente significativa en cuanto a la formación de biomasa, Es decir, la selección del tratamiento mas efectivo en cuanto a esta variable puede hacerse de manera arbitraria. La gráfica dada por el software STATGRAPHICS Plus 5.1, para la densidad óptica alcanzada por los diferentes consorcios se muestra a continuación en la gráfica 19.

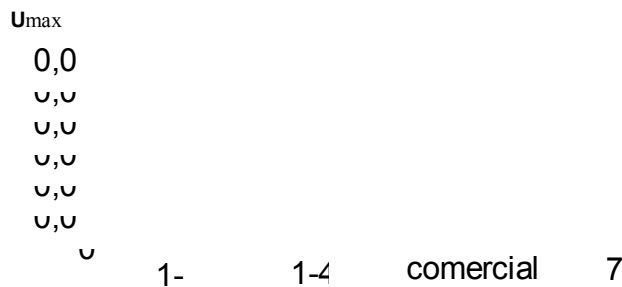
Gráfica 16. Evaluación de los consorcios con variable dependiente densidad óptica.



La formación de biomasa a pesar de no ser significativamente diferente para los consorcios evaluados es mayor para el consorcio 1,4 y el consorcio 1,4,7. La cepa 7 presenta una formación de biomasa menor a los consorcios ya nombrados y el consorcio comercial es el de menor formación de biomasa.

4.7.2 Análisis de la velocidad específica máxima de crecimiento: A continuación, en la gráfica 17 se presentan las velocidades específicas máximas de crecimiento obtenidas para los diferentes consorcios a partir de las cinéticas de crecimiento.

Gráfica 17. Velocidades específicas máximas de crecimiento para los consorcios.



Se puede observar en la gráfica que la velocidad específica máxima de crecimiento varía significativamente de un consorcio a otro. Los

μ_{\max} de los consorcios conformados por cepas nativas se mostraron superiores, casi en una proporción 2 a 1 a aquel presentado por la cepa nativa individual; esto podría indicar que la coexistencia de varias cepas nativas genera un crecimiento más acelerado. Sin embargo nótese que el consorcio 1-4 presenta una μ_{\max} significativamente superior a la del consorcio 1-4-7 ($0,0543 > 0,0453$), podría decirse que la presencia de una tercera cepa generó algún grado de inhibición en el crecimiento de este consorcio; sobre todo conociendo los resultados obtenidos en las pruebas de inhibición bacteriana.

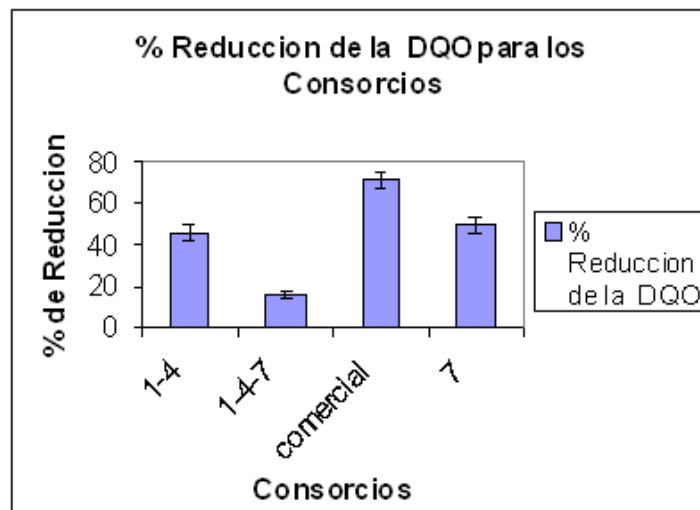
Con respecto al consorcio comercial se encontró que su velocidad específica máxima de crecimiento es significativamente inferior a la de los consorcios nativos y que no presenta diferencias significativas entre la cepa nativa individual, es decir, este se comporta similar a las cepas nativas cuando se encuentran solas.

El valor P correspondiente al análisis de varianza para el factor consorcio y la variable dependiente μ_{\max} es de 0,0016. Como este valor es menor que el valor de significancia (= 0.05) existe una diferencia estadísticamente significativa en cuanto a la velocidad específica máxima de crecimiento.

De acuerdo con los resultados (ver anexo F) el consorcio que presentó una mayor μ_{\max} es el consorcio nativo 1-4 el cual presenta diferencias significativas con los demás consorcios, seguido por el consorcio nativo 1-4-7 también significativamente diferente. El consorcio comercial y la cepa individual presentaron un comportamiento homogéneo obteniendo los menores valores de μ_{\max} .

4.7.3 Análisis de la reducción de la DQO: A cada uno de los consorcios se les evaluó la capacidad de reducir la carga orgánica presente en el agua residual, para esto se graficaron los porcentajes de reducción de la DQO obtenidos para cada uno de los consorcios (gráfica 18)

Gráfica 18. Porcentaje de reducción de DQO para los consorcios y cepa 7.



Con respecto a la capacidad de degradación de la materia orgánica, se encontró que el consorcio comercial es significativamente más efectivo que los demás consorcios evaluados, este alcanzó una reducción del 73% mientras que las demás alcanzaron reducciones del orden del 50% para el consorcio con mejores resultados a base de las cepas nativas (consorcio 1-4). Por otro lado, cuando se comparó la capacidad reductora de los consorcios nativos con la cepa

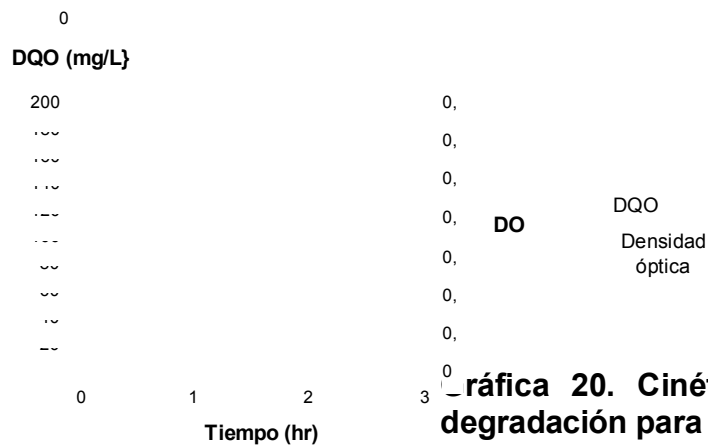
individual se vió que no existen diferencias significativas. Con respecto a la reducción de la carga orgánica presente en las aguas residuales tratadas, las cepas nativas no presentan sinergia; en caso de implementar un tratamiento empleando cepas nativas se obtienen iguales resultados empleando la cepa 7 sola, que al emplear el consorcio de cepas 1-4.

Igualmente se observó que, el consorcio nativo 1-4-7 fue el que presentó la reducción más baja con diferencias significativas con respecto a los demás tratamientos, esto se debe probablemente a la existencia de inhibición entre las cepas que componen este consorcio (resultados de las pruebas de inhibición). Es importante, al trabajar con consorcios microbianos, asegurar que no se presenten inhibiciones entre los microorganismos empleados ya que en caso contrario, no se logra una sinergia y se deterioran los posibles resultados.

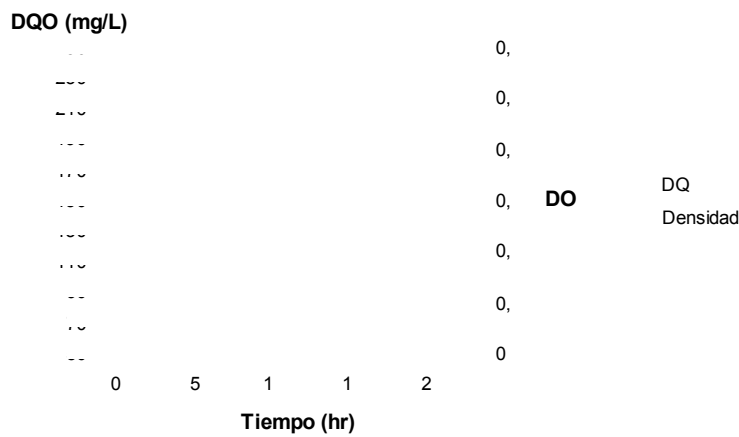
El valor P correspondiente al análisis de varianza para el factor consorcio y la variable dependiente reducción de la DQO es de 0,00. Como este valor es menor que el valor de significancia ($= 0.05$) así se corrobora la existencia de diferencias significativas.

4.7.4 Cinéticas de degradación de DQO: En las graficas 19, 20 y 21 se pueden observar las cinéticas de crecimiento y de degradación de la carga orgánica (DQO) para el consorcio nativo 1-4, la cepa 7 y el consorcio comercial.

Gráfica 19. Cinética de crecimiento de degradación para el consorcio 1-4.



Gráfica 20. Cinética de crecimiento de degradación para la cepa 7



Gráfica 21. Cinética de crecimiento y de degradación para el consorcio comercial.

En los tres casos es evidente la reducción en la DQO y el aumento de la biomasa. Para las cinéticas de degradación, al igual que para las cinéticas de crecimiento, se pueden percibir diferentes fases. En primera instancia se observa una fase lag (se evidencia en la cepa 7 y en el consorcio comercial), seguida por una fase exponencial (en donde hay un aumento exponencial para la biomasa y una disminución exponencial para la DQO) y una posterior fase

estacionaria en donde no hay cambios significativos en el tiempo ni para la biomasa ni para la degradación de DQO.

En el caso específico de la cepa 7 se evidencia una fase lag de 5 horas en la cinética de degradación de DQO y una fase lag de 3 horas para la cinética de crecimiento. Luego de la fase lag para la curva de degradación de DQO se presenta una fase de decrecimiento acelerado con una duración de 11 horas y luego de la hora 16 se estabiliza la DQO del agua residual. Para la cinética de crecimiento se presenta luego de la fase lag una fase exponencial de 15 horas y luego una fase estacionaria donde la biomasa no varía en el tiempo.

Para el caso de los consorcios se ve una relación cercana entre ambas las variables reducción de DQO y Densidad Óptica. Sólo para el consorcio comercial se presentó fase lag. Se apreció un crecimiento de la biomasa y una reducción de la DQO acelerado desde el origen de las cinéticas para los consorcios nativos y luego a las 19 horas se logra una fase estacionaria. Puede observarse una relación cercana entre ambas variables. Esto era de esperarse ya que los microorganismos extraen carbono de la fuente de carbono del medio (agua residual) reduciendo la DQO y lo destinan a la formación de biomasa aumentando la biomasa.

Tras haber evaluado el proceso de biodegradación con cepas nativas, sometidas y no sometidas a procesos de adaptación, aprovechar la posible sinergia entre estas y emplear consorcios de microorganismo eficiente, se encontró que empleado este proceso por si solo no logra el cumplimiento total de la norma. En el mejor escenario correspondiente al consorcio comercial de microorganismos eficientes, no se logra la reducción del 80 % en la carga orgánica. En cuanto a los demás parámetros la norma se cumple, sin embargo, en un proceso donde se complemente el tratamiento biológico con tratamientos primarios y terciarios,

se puede lograr la reducción de la normatividad y hasta en mayor proporción para lograr un reuso del agua (Tabla 18).

Vale la pena resaltar que la reducción en la carga orgánica se evaluó como la reducción de la DQO y no como la reducción en la DBO₅ tal como se expresa en el decreto 1594 de 1984. Esto basándose en las recomendaciones de la literatura en donde se habla de la DBO₅ como una variable no reproducible cuya variación se puede medir en términos de variación en la DQO, medida reproducible y confiable (Asociación de Ingenieros Sanitarios de Antioquia, 1993; Crites y Tchobanoglous, 2000):

Tabla 18. Reducción de DQO en los procesos de tratamiento de aguas residuales (Min Ambiente, 2002) .

Tratamiento Primario	Proceso	Reducción DQO
Primario	cribado	40%
	Tratamiento mecánico	50%
Secundario	Biológico	70%
Terciario	Desinfecciones	70%
	Decantaciones	70%

5. EVALUACIÓN ECONÓMICA TRATAMIENTO BIOLÓGICO

5.1 REQUERIMIENTOS DEL PROCESO

5.1.1 Materias Primas: Para el proceso de tratamiento biológico se emplearán las siguientes materias primas:

Cepas microbianas: Microorganismos conservados en agar nutritivo o Consorcio Comercial Bacthon conservado a una temperatura de 4° C.

Agua de efluente previamente clarificada: El agua efluente del proceso de producción de Pintura Base Agua se clarifica y posteriormente pasa al proceso biológico. Esta agua contiene el Polímero NOVA y algunas trazas de materias primas de pinturas base agua, además una serie de microorganismos que compiten con las cepas aisladas.

5.1.2 Equipos requeridos: Para el tratamiento se requieren una serie de equipos que se presentan en la Tabla 19. La bomba dosificadora lleva el fluido hasta la piscina de biorremediación, se tiene en cuenta su posible uso y costo, pero es probable que el proceso no la requiera y se trabaje solo por gravedad. El compresor de aire es el encargado de comprimir el aire que estará oxigenando la piscina de biorremediación.

La piscina se tiene en cuenta para los costos, pero en la planta hay disponibilidad de usar un pozo donde en este momento se depositan las aguas para clarificación, que puede ser adaptado para utilizarlo como piscina.

Las tuberías permiten el transporte del fluido hasta la piscina y desde la piscina hasta el tanque de almacenamiento. Estas pueden ser en PVC, pues el fluido no es corrosivo y no presenta contraindicaciones a este material.

El tanque de almacenamiento permite almacenar las aguas tratadas para tenerlas listas para una posterior disposición.

Tabla 19. Equipos requeridos para tratamiento biológico de efluentes.

Equipo	Precio (pesos)	Necesidad
Bomba Dosificadora	\$ 800.000	1
Compresor de aire	\$ 800.000	1
Piscina	\$ 1.000.000	1
Tuberías	\$ 300.000	15 mts
Tanque de almacenamiento	\$ 1.000.000	1
TOTAL	\$3.900.000	

5.1.3 Inversiones Fijas: Las inversiones fijas que deben realizarse para el desarrollo del proyecto básicamente son la construcción de la piscina de biodegradación y apertura de espacios para el proceso (en la planta se encuentra una zona definida para este fin, en la planta de clarificación de

aguas), obras civiles también relacionadas con este propósito, la maquinaria y equipos y los repuestos y herramientas necesarios.

5.1.4 Inversiones diferidas: Las inversiones diferidas tienen en cuenta los gastos de organización y de ingeniería, los gastos de montaje de la planta, la instalación, pruebas y puesta en marcha, la capacitación de los operarios encargados y algunos gastos financieros que puedan presentarse.

Tabla 20. Inversiones diferidas para el proyecto con tratamiento biológico.

Inversiones diferidas	\$ 700,000
Gastos de organización	\$ 200,000
Gastos de montaje	\$ 100,000
Instalación, pruebas y puesta en marcha	\$ 260000
Licencias	\$ 0
Capacitación	\$ 90,000
Gastos financieros durante la instalación	\$ 50,000

5.1.5 Capital de trabajo: El capital de trabajo se presenta en la tabla 22. En ella pueden apreciarse los rubros correspondientes.

Tabla 21. Capital de trabajo para el proyecto

Concepto	Valor (pesos)
Capital de trabajo	\$ 1.000.000
Efectivo y bancos	\$ 800.000
Inventario de materia prima y materiales	\$ 0
Productos en proceso	\$ 0
Inventario de productos terminados	\$ 0
Cuentas por cobrar	\$ 0
Cuentas por pagar	\$ 200.000

5.1.6 Gastos preoperativos: Los gastos preoperativos del proyecto fueron cubiertos por la Universidad EAFIT, por tanto no se tienen en cuenta para la adopción del proyecto por parte de CGP. Estos son aquellos gastos para el trabajo de laboratorio realizado en la Universidad.

5.1.7 Costos: Los costos de operación corresponden a costos directos, de los cuales la mayor proporción son las materias primas y materiales.

Los servicios públicos como la electricidad se valoran en \$50000/mes aprox. Teniendo en cuenta posible uso de electricidad de la planta de la empresa. Además, se valoró el mantenimiento de equipos y sistemas, pero sólo en una proporción, pues una sola persona de mantenimiento se encarga no sólo de la planta de clarificación sino también de la zona de envase y de empaque.

Se tiene en cuenta también el costo de un seguro para los equipos y los impuestos indirectos se incluyen en otros rubros.

Tabla 22. Costos de Operación para el tratamiento biológico

Concepto	Valor /año
Costos de Operación	\$ 2.233.000,00
Costos directos	\$ 900.000,00
Materias primas y materiales	\$ 900.000,00
Costos indirectos	\$ 1.333.000,00
Servicios	\$ 600.000,00
Mantenimiento	\$ 433.000,00
Seguros	\$ 300.000,00
Impuestos indirectos	\$ 0,00
Gastos de comercialización y distribución	\$ 0,00

5.1.8 Ingresos Los ingresos que se estiman se deben a los rubros que dejan de pagarse a EPM por agua para el proceso, pues, el agua que se trate entrará a ser utilizada en los procesos de la planta. El costo unitario de m³ de agua potable es de \$ 1400 teniendo en cuenta alcantarillado. Por tanto el consumo de agua será el valor en pesos por m³ multiplicado por el número de m³ que se utilizan por año (aprox. 3150 m³ de agua/año).

Tabla 23. Ingresos del proyecto

Concepto	Valor
Ingresos	\$ 4.612.470,00
Operativos	\$ 4.410.000,00
Otros ingresos (no manejo de EPM)	\$ 150.000
Otros ingresos (tasas retributivas)	\$ 52.470,00

5.1.9 Flujo de efectivo: El Flujo de efectivo del proyecto con tratamiento biológico se presenta en la figura 5.

5.2 ANÁLISIS DE RENTABILIDAD

5.2.1 Valor presente neto: El valor presente neto del proyecto con el proceso de biorremediación es de 571.805,13 pesos colombianos, considerando una vida útil del proyecto de 5 años, la cual se fijo teniendo en cuenta la vida útil en la que se depreciaron los equipos. Como este valor es positivo, bajo los parámetros en los que se analizó, se considera que el proyecto es viable.

5.2.2 Tasa Interna de Retorno: La tasa interna de retorno (TIR) del proyecto es del 10%, lo cual indica que bajo los parámetros que se han establecido, el proyecto es factible económicamente.

5.2.3 Relación Beneficio/Costo: La relación beneficio/ costo es de 1.10 aproximadamente. Lo que indica que los ingresos superan los egresos y el proyecto es viable.

6. EVALUACIÓN ECONÓMICA DE LA SITUACIÓN ACTUAL

6.1 REQUERIMIENTOS DEL PROCESO

6.1.1 Materias Primas: Para el proceso de tratamiento actual se emplea un floculante: Polímero NOVA. Este floculante se emplearía en el proceso completo para tratamiento de aguas, por lo tanto, al no generar una carga extra para el proceso no se tiene en cuenta en los costos, pues incumbirlo en los costos implica incumbirlo en los costos del tratamiento biológico también y no representa cambio significativo.

Agua de efluente: El agua efluente del proceso de producción de pintura base agua que contiene una serie de trazas de materias primas de pintura, pigmentos, microorganismos en baja proporción, contaminantes del proceso, entre otros.

6.1.2 Capital de trabajo: El capital de trabajo se presenta en la tabla 24. En ella pueden apreciarse los rubros correspondientes.

Tabla 24. Capital de trabajo para la situación actual

Concepto	Valor (pesos)
Capital de trabajo	\$ 1.000.000

Efectivo y bancos	\$ 800.000
Inventario de materia prima y materiales	\$ 0
Productos en proceso	\$ 0
Inventario de productos terminados	\$ 0
Cuentas por cobrar	\$ 0
Cuentas por pagar	\$ 200.000

6.1.3 Costos: Lo que se tomaron como costos para esta parte de la evaluación son los rubros correspondientes al agua que deja de reprocesarse y que debe comprarse a EPM para su uso. El m³ de agua de EPM tiene un costo de \$1400. Se dejan de reprocesar cerca de 9 m³/día. Además se tienen en cuenta las tasas retributivas a pagar, cuyo costo es de \$87.45 por cada mg/L de DBO y los otros gastos por el uso de agua de EPM.

Tabla 25. Costos del proceso como se realiza actualmente

Concepto	Valor
Costos	\$ 4.612.470,00
Agua EPM	\$ 4.410.000,00
Otros ingresos (no manejo de EPM)	\$ 150.000
Otros ingresos (tasas retributivas)	\$ 52.470,00

6.1.4 Ingresos: No se tienen ingresos por el proceso actual, pues esto se hace como forma de evitar cargas contaminantes a los efluentes. No como forma de agregar valor agregado a los efluentes.

6.1.5 Flujo de efectivo de la situación actual: El flujo de efectivo de la situación actual se presenta en la Figura 6.

6.2 ANÁLISIS DE RENTABILIDAD

6.2.1 Valor presente neto: El valor presente neto del proyecto con el proceso actual es de -15.399.872,62 pesos colombianos, considerando una vida útil del proyecto de 5 años, la cual se fijó teniendo en cuenta la vida útil en la que se depreciaron los equipos existentes. Como este valor es positivo, bajo los parámetros en los que se analizó, se considera que este es poco viable o sólo se realiza para fines benéficos (en este caso para el ambiente).

6.2.2 Tasa Interna de Retorno: La tasa interna de retorno (TIR) del proyecto es de 0%, lo cual indica que bajo los parámetros que se han establecido, el proyecto no es factible económicamente.

6.2.3 Relación Beneficio/Costo: La relación beneficio/ costo es de -14 aproximadamente. Lo que indica que los egresos superan los ingresos y el proyecto no es rentable.

7. PROCESOS COMPLEMENTARIOS AL PROCESO PARA REDUCIR LA CARGA ORGÁNICA Y LOGRAR AGUAS PARA REPROCESO

Dentro del campo de tratamiento de aguas efluentes y/o residuales se han presentado cambios tecnológicos apreciables. La variedad de posibles métodos de tratamiento aumenta, sin embargo, los métodos que han comprobado su eficiencia son de tres tipos: biológicos, físicos y químicos. Estos a su vez se combinan entre sí en una gran variedad de formas creando sistemas bioquímicos o físico-biológicos (Crites y Tchobanoglous, 2000).

En este proyecto se proponen dos procesos para el tratamiento de aguas efluentes de la Planta Base Agua de la CGP. Ambos utilizan los tres tipos de procesos para tratamientos de aguas: procesos biológicos, físicos y químicos, además de los tres tipos de tratamientos: primarios, secundarios y terciarios. Siguiendo los procesos propuestos se garantiza el cumplimiento del Decreto 1594 de 1984 y además se reduce la carga orgánica de las aguas efluentes.

El proceso número 1 se compone de un tratamiento primario con un filtro de malla, el cual, permite separar los sólidos de mayor tamaño y otros sólidos

suspendidos de diámetro mayor a las mallas. Luego de este tratamiento se da inicio a un tratamiento secundario consistente en el tratamiento biológico. Los efluentes permanecen un tiempo de 20 horas aproximadamente en la piscina de tratamiento estando en contacto con los microorganismos y además de los microorganismos se agrega el floculante. Una vez el tiempo indicado finaliza, la porción líquida pasa a un tratamiento terciario de desinfección, en el cual, el efluente del proceso biológico se pone en contacto con hipoclorito de sodio al 2% para matar los microorganismos que permanezcan en el seno del fluido y por último se realiza una filtración con arena para garantizar mejor calidad del agua.

El proceso número 2 se compone de un tratamiento primario con un filtro de malla, luego de este tratamiento se realiza una clarificación con un polímero floculante, en este proceso el floculante logra aglomerar los sólidos y por el peso de los flocs caen al fondo del tanque, permitiendo que las aguas queden libres de sólidos. Las aguas clarificadas pasan entonces al proceso biológico en la piscina de tratamiento. En esta tienen un tiempo de residencia aproximado de 20 horas, en las cuales, los microorganismos por medio de su capacidad biodegradativa disminuyen la carga orgánica y por tanto reducen la DQO. Una vez este tratamiento finaliza, se pasan las aguas a un tanque de desinfección en donde el hipoclorito de sodio al 2% mata las bacterias y microorganismos presentes y logran aguas limpias y de condiciones para reproceso.

8. CONCLUSIONES

La biota obtenida a partir de las aguas residuales del proceso de pinturas generó un conjunto de 7 cepas bacterianas nativas similares del tipo bacilos y coco-bacilos gram negativos, de las cuales 4 cepas poseían características aceptables en cuanto a la capacidad reductora de la carga orgánica y capacidad de supervivencia en las aguas efluentes de la planta base agua de la CGP.

La biomasa microbiana obtenida en el proceso de biodegradación de las aguas sin fuente alternativa de carbono es relativamente baja, al igual que la velocidad específica máxima de crecimiento. Esto debido a la adversidad del medio donde crece el microorganismo.

En general el proceso de adaptación de las cepas nativas empleando una fuente de carbono sintética más fácilmente asimilable es contra productivo para el proceso de biodegradación de estos efluentes. Las cepas que son sometidas a este proceso pierden su capacidad reductora de carga orgánica entre un 5% a un 30%.

La reducción de la carga orgánica presente en los efluentes provenientes del proceso productivo la CGP para la producción de pinturas a base agua se logra al emplear procesos de biodegradación con microorganismos nativos aislados de las aguas o empleando microorganismos eficientes, ambos son capaces de asimilar la fuente de carbono presente en estas aguas.

La mayor reducción de carga orgánica se logra al emplear consorcios de microorganismos eficientes (Bacthon®) alcanzando reducciones de un 73% de

la carga en un periodo de 30 horas aproximadamente. Al emplear microorganismos nativos se alcanzan reducciones del orden de 50% en un período de 30 horas dependiendo de las cepas empleadas (cepas 1, 3, 4 y 7), siendo irrelevante si se emplean de manera individual o como consorcios, ya que entre las cepas no se presenta sinergia; esto siempre y cuando las cepas no tengan efectos inhibitorios entre ellas.

Para las cepas evaluadas se encontraron efectos inhibitorios entre algunas de estas (grupo de cepas 1 y 4 con la cepa 7,) de aquí la necesidad de controlar las cepas empleadas en el proceso ya que de utilizar cepas que se inhiben entre si se reduce notablemente la efectividad de la biodegradación. ■

El proceso de biodegradación del agua residual de la planta de producción de pintura a base agua de la CGP es un proceso viable económicamente ya que la TIR alcanzada es del 10% en comparación con el proceso actualmente utilizado que es de 0%

El empleo de un proceso de biodegradación trabajado individualmente no genera el cumplimiento de la norma de vertimiento presentada en el Decreto 1594/1984. Por ende es necesario emplear otras operaciones primarias, secundarias y terciarias complementarias.

Las aguas tratadas por el proceso compuesto por tratamientos primarios, secundarios y terciarios pueden ser empleadas en procesos secundarios en la planta generando una disminución en los costos de utilities y de materias primas. Si se logra una desinfección adecuada es posible lograr el reproceso en el proceso de producción de pinturas base agua.

9. RECOMENDACIONES

- Evaluar la degradación de la carga orgánica alcanzada por el consorcio comercial basado en microorganismos eficientes en su totalidad, hasta que la reducción de la DQO no sea significativa en el tiempo. Con el fin de determinar el potencial de degradación que presenta este consorcio en esta agua, el tiempo de duración del proceso y su viabilidad económica.
- Realizar una evaluación similar a la que se planteó en este proyecto para los efluentes de la planta pinturas a base agua de la CGP antes de llevar acabo el proceso de clarificación, esto con el fin de observar el potencial de la biodegradación en este punto.
- Realizar el escalado del proceso a nivel industrial para evaluar su eficiencia y comparar los resultados obtenidos a nivel del laboratorio.
- Llevar acabo la identificación molecular de las cepas microbianas para profundizar mas la investigación conociendo los posibles metabolitos producidos por la cepa, la caracterización de la cepa y su patogenicidad, entre otros factores que pueden afectar el proceso de una u otra manera.

10. BIBLIOGRAFÍA

AMBROSIO, S.T. y TAKAKI, CAMPOS, G.M. 2004. Decolorization of reactive azo dyes by *Cunninghamella elegans* UCP 542 under co-metabolic conditions. En: Bioresource Technology. Vol. 91. p.p. 69-75.

AMÉZAGA, I.; GARBISU, C. y ALKORT, I. 2002. Biorremediación y ecología. En: Revista de divulgación científica y técnica de ecología y medio ambiente. Vol. 3. p.p 351-358.

APH, AWWA, WPCF. 1992. Manual de DQO. p.p. 1-15.

ASOCIACIÓN DE INGENIEROS SANITARIOS DE ANTIOQUIA. 1993. Tratamiento Biológico de Aguas Residuales. Editorial INSA. Medellín.

BANAT, I.M; RAHMAN, K.S.M.; RAHMAN, T. Y LAKSHMANAPERUMALSAMY, P. 2002. Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium. En: Bioresource Technology. Vol. 85 (3). p.p. 257-261.

BANAT, I.M; RAHMAN, K.S.M.; RAHMAN, T; KOURKOUTAS, Y; PETSAS, I; MARCHAND, R. 2002. Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. En: Bioresource Technology. Vol. 90. (2). p.p. 159-168.

BASHAN, Y. y DE BASHAN, L.E. 2005. Plant growth promoting. En: Encyclopedia of soils in the environment. Vol. 1. p.p. 103-115.

BASU, M.; ATTACHARYA, S. ; PAUL, A.K. 1996. Isolation and Characterization of Chromium-Resistant Bacteria from Tannery Effluents. En: Environmental Contamination and Toxicology. Vol 58. pp. 535-542.

BECERRA, C. 2007. Optimización de un medio de cultivo para la producción de biomasa de la cepa *Pseudomonas putida* UA-44 aislada del suelo bananero de Urabá –Antioquia. Universidad EAFIT. Medellín.

BECKER, J.; CALDELL, M; GUY A y ZACHGO E. En: 1999 Biotechnology: a laboratory course. Segunda edición. Academia Press. USA.pp

BENAVIDES, J. 1999. Aplicaciones biotecnológicas en el tratamiento de aguas residuales en textiles. En: Colombia Textil. Vol. 132. p.p. 17-25.

BLOUNDEAU, R. y PARIS, D. 1998. Isolation and characterization of *Arthrobacter sp.* From activated sludge of a pulp and paper mill. En: Wat. Res. Vol. 33 (4). p.p 947-950.

BOOPATHY, R. 2006. Factors limiting bioremediation technologies. En: Bioresource Technology. Vol. 74. p.p. 63-67.

CARRILLO, E.; RUIZ, A. y YEOMANS, H. 2004. Aislamiento, identificación y evaluación de un cultivo mixto de microorganismos con capacidad para degradar DDT. En: Revista Colombiana de Contaminación Ambiental. Vol. 20 (2). p.p. 66-75.

CFEM. 2007. Práctica de Farmacia. Análisis Microbiológicos Básicos. Alarquim. p.p. 1-3.

CONSUEGRA R. 2007. Norma Mexicana de potabilización del agua para uso y consumo humano – poliacrilamidas – especificaciones y métodos de prueba. Secretaría de Salud. México D.F. p.p. 7-25.

COSTA, R., GOMEZ, C.M., PEIXOTO, R., RUMJANEK, N., BERG, G., MENDONCA, L., SMALLA, K. 2006. Diversity and antagonistic potential of *Pseudomonas* spp. associated to the rhizosphere of maize grown in a subtropical organic farm. En: Soil Biology and Biochemistry. Vol. 38, Issue 8, p.p. 2434-244.

COTO, C.. Curso de Introducción al Conocimiento científico experimental. 2000. En: Revista Química Viva. Vol. 15. p.p. 45-47.

CRITES, R. y TCHOBANOGLOUS, G. 2000. Tratamiento de aguas residuales en pequeñas poblaciones. Edit. Mc Graw Hill. Colombia.

DECRETO 1594.1984. Usos del agua y residuos líquidos. Santa Fe de Bogotá. p.p. 19-21.

DEPARTAMENTO DE SANIDAD DEL ESTADO DE NEW YORK. 1998. Manual de tratamiento de aguas negras. Edit Limusa. USA.

DORAN, M.P.1999. Bioprocess Engineering Principles. Academic Press Limited. London. p.p 439

ELSHAFIE, A.; ABDULAZIS, A.; AL-BYAIDI, S.; BAKLEIT, C.; y ALBAHRY, S.N. 2007. Biodegradation of crude oil and n-alkanes by fungi isolated from Omar. En: Marine Pollution Bulletin.

FERNÁNDEZ, F.J.; VILLASEÑOR, J.; RODRIGUEZ, L. Y DE LUCAS, A. Biodegradation kinetics of stored wastewater substrates by a mixed microbial culture. 2005. En: Biochemical Engineering Journal. Vol. 26 (2-3). p.p. 191-197.

FERRERO, J.M. 1974. Depuración Biológica del agua. Editorial Alambra. Méjico. p.p 56-62.

GILIO VILCA, J.; y VIDO SAL Y ROSAS M. 2007. Biorremediación de los efluentes de la acuicultura. Revista Aqua Hoy. Enero de 2007.

HE, F.; HU, W.; y LIYUEZHONG. 2004. Biodegradation mechanisms and kinetics of azo dye 4BS by a microbial consortium. En: Chemosphere. Vol. 57. p.p 293-301.

HESS, T.F.; SCHMIDT, S.K; SILVESTERN, S.; y HOBE, B. 1990. En: Applied and environmental microbiology. Vol 56 (6). p.p. 1551-1558.

KATSURAGI, T.; IWAHASHI, M.; TANI, Y.; TSUTSUMI, K.; y KAKIUCHI, K. 2003 Mechanism for degradation of poly(sodium acrylate) by bacterial consortium no. L7-98. En: Journal of Bioscience and Bioengineering. Vol 95 (3). p.p. 483-487.

KUSHMARO, A.; ABELIOVICH, A.; y SEGEV, O. Biodegradation of dibromoneopentyl glycol by a bacterial consortium En: Chemosphere. Vol. 68. Issue 5. p.p. 958-964.

LI, J.; WEIJAN, C; y ZHANG, Z. 2007. The characteristics and mechanisms of phenol biodegradation by *Fusarium* sp. En: Journal of Hazardous Materials. Vol 148. Issues 1-2, p.p 38-42

LIMA, N.; QUEIROZ, M.; SANTOS M. I FERREIRA I C. y MARTINS M. A. 2001. Biodegradation of bioaccessible textil azo dye by *Phanerochaete chrysosporium*. En: Journal of Biotechnology. Vol. 89. #p. 91-98.

LLANO, A.L. 2007. Escalamiento del proceso de producción de un insecticida biológico a escala piloto para la empresa Productos Naturales de la Sabana s.a., Alquería. Universidad EAFIT. Medellín. p.p 55.

LORD ARROYO E.L. 2002. Utilización de *Lactobacillus acidophilus* como agente antagónico para el control de *Salmonella enteritidis* en pescado. Universidad Nacional de Colombia. Cartago.

MEHMETOĞLU U., MEHMETOĞLU T., BAYRAKTAR E. y ABUHAMED T. 2004. Kinetics model for growth of *Pseudomonas putida* F1 during benzene, toluene and phenol biodegradation. En: Process Biochemistry. Vol. 39. p.p. 983-988.

MERCK. 2006. Catálogo de Productos. USA. p.p 153.

MILOVSKI, A. y KÓNONOV, O. V.. 1982. Mineralogía. Moscú. p. 319.

MINISTERIO DEL MEDIO AMBIENTE. 2002. Guía ambiental para la formulación de planes de pretratamiento de efluentes industriales. Minambiente. Colombia.

MORENO, D; FUENTES, J; SÁNCHEZ, ÁNGEL; BALUIA, LIGIA; PRIETO, ENRIQUE. 2004. Conversión y reversión génica en *saccharomyces cerevisiae*. un modelo para el estudio del daño producido por radiación gamma. En: Revista Cubana de Investigación Biomédica. Vol. 23 (2). p.p. 80-86.

ORIOUS BIOTECNOLOGÍA. 2007. Especificaciones Bachtón SC. Tierragro. Medellín.

PAZARLIOGLU KASIKARA NURDAN y TELEFONCU AZMI. 2004. Biodegradation of phenol by *Pseudomonas putida* immobilized on activated pumice particles. En: Process Biochemistry. Vol. 40. p.p.1807-1814.

PEARCE, C.I; LLOYD, J.R. y GUTHIE, J.T. 2003. The removal of colour from textile wastewater using whole bacterial cells: a review. En: Dyes and pigments. Vol. 58. p.p 179-196.

RAMALHO, R.S. 1996. Tratamiento de aguas residuales. Editorial Reverté. Canadá.

RODRÍGUEZ, S. 1986. Recursos minerales de Venezuela. En: Boletín del Ministerio de Energía y Minas. Caracas. Vol. 15 (27). p.p 215.

ROMERO ROJAS, J. A. 1999. Tratamiento de aguas residuales. Teoría y principios de diseño. Editorial Escuela Colombiana de Ingeniería. Bogotá.

SALAZAR, A. 1993. Teoría del tratamiento biológico. AINSA. Medellín.

SANDHYA, S.; PADMAVATHY, S.; SWAMINATHAN, K.; SUBRAHMANYAM, Y.V.; y KAU, L S.N. 2005. Microaerophilic-aerobic sequential batch reactor for treatment of azo dyes containing simulated wastewater. En: Process Biochemistry. Vol 40 (2) P. 885-890.

SAVAL, S. 1999. Periodismo de Ciencia y Tecnología. En: Investigación y Desarrollo. Vol. 21. p.p 17-20.

SAWYER, C.N.; Mc CARTY, P.L.; y PARKING, E.S. 1994. Chemistry for environmental engineering. Cuarta edición. Mc. Graw Hill. New Cork p.p.128.

SGOUNTZOS, I.N.; PAVLOU, S.; PARASKEVA, C.A. y PAYATAKES, A.C. 2006. Growth kinetics of *Pseudomona fluorescens* in sand beds during biodegradation of phenol. En: Biochemical Engineering Journal. Vol 30. p.p. 164-173.

SHARMA KUMAR, D.; SINGH, H.; KHEHRA, M. S.; CHADHA, B.D. y CHIMNI S.S. 2006. Biodegradation of azo dye C.I. Acid Red 88 by an anoxic-aerobic sequential bioreactor En: Dyes and Pigments. Vol. 70(1). p.p. 1-7.

SIMET, 2000. Sistema de información metrológica. Editorial SIMET. Bogotá, Colombia. p.p. 21-22.

SNADHYA, S; PADMAVATHY, S.; SWAMINATHAN, K.; SUBRAHMANYAM, Y.V. y KAUL, S.N. 2005. Microaerophilic-aerobic sequential batch reactor for treatment of azo dyes containing simulated wastewater. En: Process Biochemistry. Vol 40. p.p. 885-890.

STANDAR METHODS. 1995. Standard Methods for the examination of water and waste water. American public health association. Washington D.C.

SUDHAKAR, M.; DOBLE, M.; MURTHY, S. y VENKATESAN, R. 2007. Marine microbe-mediated biodegradation of low- and high-density polyethylenes. In Press Corrected. En: International Biodeterioration & Biodegradation. Vol 15. p.p. 451-459.

TALARPOSHTI, A.; MAHDAVI, D.T. y ANDERSON, G.K. 2000. Colour removal from a simulated dye wastewater using a two-phase anaerobic packed bed reactor. En: Water Resistance. Vol. 35 (2). pp. 425-432.

URIBE, S. 2007. Compañía Global de Pinturas presentación en ppt. Pintuco. Colombia.

VIDALI, M. 2001. Bioremediation. An overview. En: Pure Applation of Chemistry. Vol 73 (7), pp. 1163–1172.

WATER POLLUTION CONTROL FEDERATION. 1989. Calidad del Agua. New York. p.p. 432-439.

11. CIBERGRAFÍA

LENNTECH. 2000. Calidad del agua: el pH. Acceso: Junio 18 de 2007.

<http://www.lenntech.com/espanol/pH-y-alcinidad.htm>

MARLOTO, E. y ROGEL, J. 2004. Aplicación de Sistemas de biorremediación de Suelos y Aguas Contaminadas Por Hidrocarburos. Acceso: Junio 18 de 2007.

http://www.igme.es/internet/web_aguas/igme/publica/con_recu_acuiferos/028.pdf

PEZ. 2006. Bioquímica del Agua. Acceso: Septiembre 29 de 2007.

<http://www.drpez.com/drblog.htm>

TEBUTT. 1999. EL AGUA. Acceso: Junio 16 de 2007.

<http://www.tecnun.es/Asignaturas/Ecologia/Hipertexto/11CAgu/100CoAcu.htm>

ANEXOS

ANEXO I. Ficha técnica y Hojas de seguridad polímeros para floculación.

Polímero NOVA C-225

COAGULANTE

El **NOVA C-225** es un polímero coagulante y floculante catiónico utilizado en el tratamiento de aguas potables y residuales para eliminar la turbidez ocasionada por los sólidos en suspensión. También ayuda en la reducción y sedimentación del hierro y el color presentes.

- Elimina color y materia orgánica.
- Reduce y sedimenta el hierro presente.
- Trabaja en un amplio rango de pH (5.0 – 8.5).
- Reemplaza hasta en un 100% el sulfato de aluminio.
- Se puede dosificar puro y es 100% soluble en agua.
- Proporciona un excelente balance técnico-económico.

DESCRIPCIÓN

El **NOVA C-225** es un polímero catiónico con alto peso molecular.

PROPIEDADES

Apariencia	: Líquido
Color	: Transparente - Ambar
Olor	: Dulce
Solubilidad	: Total
Densidad gr/ml	: 1.31-1.34

DOSIFICACIÓN

La dosis de **NOVA C-225** depende del contenido de sólidos presentes en el agua a

tratar y del hierro que se desea reducir. Para la determinación de las dosis óptimas se deben realizar pruebas de jarras con una muestra representativa del agua a tratar, ó con base en la experiencia dosificar directamente a la planta de tratamiento, tomando como base la dosis de sulfato de aluminio utilizada normalmente.

ALIMENTACIÓN

Se debe dosificar con bomba en forma continua, preferiblemente directo desde el tambor de suministro, inyectándolo en un punto de buena agitación como la entrada de agua a la planta de tratamiento.

MANEJO

El **NOVA C-225** puede causar irritaciones en la piel debido a su característica ácida. Por tal razón se deben utilizar los implementos de seguridad recomendados para estos productos, como guantes y gafas. En caso de contacto lave **INMEDIATAMENTE** con abundante agua los ojos y la piel por lo menos durante 15 minutos. Para los ojos consiga atención médica.

Se deben evitar también los derrames del producto ya que el suelo se vuelve liso y se pueden ocasionar accidentes.

EMPAQUE Y ALMACENAMIENTO

NOVAQUÍMICA

Tratamiento de aguas
Boletín Técnico
NOVA C-225

PBC-03 Versión 1
Página 2 de 1

El **NOVA C-225** viene empacado en tambores de 150 y 270 kgs. También se despacha a granel.



TARJETA DE EMERGENCIA : NOVA C-225 POLIMERO CATIONICO

PRODUCTO : NOVA C-225 POLIMERO CATIONICO

1. IDENTIFICACION DEL PRODUCTO QUIMICO/ EMPRESA		
NOVAQUIMICA Circular 4 #71-64 LAURELES Tel: 416 26 22 / 416 10 61 lunes a viernes de 7:30 a.m. A 6:00 p. y sabados 8:00 a.m. A 12:00m e-mail: comercial@novaquimica.com.co	PRODUCTO QUIMICO Codigo interno: NOVA C-225 Sinonimia: polinuclear catiónico. Formula quimica: Mezcla Peso Molecular: Mezcla	
EMERGENCIAS QUIMICAS LLAMAR A CISPROQUIM 01 8000 916012 FUERA DE BOGOTA O 288 60 12 BTA		
2. IDENTIFICACION DE PELIGRO		
CONTACTO OJOS: Producto corrosivo, el contacto directo con el material puede causar daño en los ojos. INGESTION: corrosivo, la ingestión causa quemaduras de inmediato en boca, garganta, esófago y tracto gastrointestinal. Puede causar náuseas, vómito y diarrea. La ingestión puede ser fatal. CONTACTO PIEL: El contacto prolongado o repetido con la piel puede causar enrojecimiento, dolor y quemaduras de la piel.		
3. EQUIPO DE PROTECCION PERSONAL/ CONTROLES DE EXPOSICIÓN		
PROTECCION RESPIRATORIA: N.A. VENTILACION EXTRACCION: GENERAL: X ESPECIFICA: TIPO DE GUANTES DE PROTECCION: Manipule con guantes de goma. TIPO DE LENTES PROTECCION: Lentes de seguridad para quimicos (goggles). PROTECCION ADICIONAL: Petos y botas de caucho. Es importante el tener una ducha de seguridad con lava ojos cerca del sitio de manipulación.		
4. MEDIDAS DE PRIMEROS AUXILIOS		
CANTIDAD AMBIENTAL MAXIMA PERMISIBLE: No establecida. OJOS: Lave con abundante agua por lo menos durante 15 minutos. Acuda de inmediato a un médico. PIEL: Lave con abundante agua y jabón. Retire la ropa contaminada con el producto. INGESTION: No induzca al vomito. Suministre grandes dosis de agua. No de nada de beber a personas inconscientes. Llame a un médico.		
5 MEDIDA PARA EXTINCIÓN DE INCENDIOS		
PUNTO DE IGNICIÓN: Ninguno. AGENTE DE EXTINCIÓN: No aplica. PROCEDIMIENTOS ESPECIALES PARA COMBATIR EL FUEGO: Ninguna. PELIGRO DE EXPLOSIÓN Y DE FUEGO IMPREVISTOS: El contacto con metales, puede liberar gas hidrógeno inflamable. En tal caso utilice CO ₂ como extintor.		
6. MEDIDAS EN CASO DE VERTIDO ACCIDENTAL		
Elimine todo riesgo de contacto con metales, no verter por el desagüe. Absorba con material inerte como arena, tierra, no utilice materiales combustibles como viruta de madera.		
7, MANIPULACION Y ALMACENAMIENTO		
CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO: Almacene en un area bien ventilada. Los envases bien cerrados cuando no se usen. Verifique periodicamente el perfecto estado de los mismos. PROCEDIMIENTOS DE MANIPULACIÓN: Evite contacto con la piel y derrames, estos tornan las superficies resbalosas. Vacie los tambores dentro del equipo de aplicación. Elimine los tambores vacios en un vertedero industrial o incinerelos según lo que permitan las autoridades estatales y locales. Si son incinerados evite la inhalacion del humo.		

APROBÓ: MAURICIO BELTRÁN CAMARGO

FECHA: OCTUBRE 27 DE 2006

Polímero Nova A-410

POLÍMERO ANIÓNICO

NOVA A-410 es un polímero floculante aniónico utilizado en el tratamiento de aguas potables y residuales para lograr la sedimentación en forma rápida de los flóculos formados después de la etapa de coagulación.

- Trabaja en un amplio rango de pH: 6–13.
- Proporciona sedimentación rápida de los sólidos en la planta de tratamiento.
- Mayor velocidad de filtración posterior.
- Fácilmente soluble en aguas.
- Proporciona un excelente balance técnico-económico, ya que trabaja a dosis muy bajas.

DESCRIPCIÓN

NOVA A-410 es un copolímero de ácido acrílico de carga aniónica y de peso molecular alto.

PROPIEDADES

Apariencia	: Polvo Granular
Color	: Blanco
Tipo de carga	: Aniónica
Olor	: Ninguno

DOSIFICACIÓN

La dosis de **NOVA A-410** depende de la aplicación ó del tipo de agua a tratar y solo se determinará por medio de las pruebas de jarras combinándose con los otros productos utilizados, como coagulantes y floculantes adicionales.

ALIMENTACIÓN

Se debe dosificar con bomba en forma continua en un sitio de buena agitación, por ejemplo, en la entrada de agua a la planta de tratamiento y luego de la adición de coagulante, a una distancia estratégica y conveniente.

Para lograr el mejor rendimiento del producto se deben preparar soluciones con una concentración máxima de 0.5% y alimentar luego con diluciones de ésta al 0.1%. La anterior puede variar dependiendo si se trata de clarificación de agua influente ó de residual.

El tiempo de preparación de las soluciones de **NOVA A-410** debe estar como mínimo entre 30 y 45 minutos con agitación constante. Esto se debe realizar de la siguiente manera:

- Bajo agitación constante, agregar **NOVA A-410** lentamente al agua (Con esto se evita la formación de grumos ó apelmazamiento).
- Continuar con la agitación durante 10 a 15 minutos.
- Dejar en reposo entre 10 a 15 minutos.
- Iniciar de nuevo la agitación por 15 minutos.



TARJETA DE EMERGENCIA : NOVA A-410 POLIMERO ANIÓNICO
PRODUCTO : NOVA A-410 POLÍMERO ANIÓNICO

1. IDENTIFICACION DEL PRODUCTO QUIMICO/ EMPRESA		
NOVAQUIMICA Circular 4 #71-64 LAURELES Tel: 416 26 22 / 416 10 61 lunes a viernes de 7:30 a.m. A 6:00 y sabados 8:00 a.m. A 12:00m e-mail: comercial@novaquimica.com.co	PRODUCTO QUIMICO Codigo interno: NOVA A-410 Formula quimica: Copolimero de amida acrilica y acrilato de sodio	
EMERGENCIAS QUIMICAS LLAMAR A CISPROQUIM 01 8000 916012 FUERA DE BOGOTA O 288 60 12 BOGOTA		
2. IDENTIFICACION DE PELIGRO		
CONTACTO OJOS: Lavar largo tiempo con mucho agua; eventualmente buscar ayuda medica. INGESTION: En caso de malestar acudir al medico. CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabon. Deshacerse de la ropa contaminada. INHALACION: En caso de malestar acudir al médico, poco probable la inhalación de grandes cantidades.		
3. EQUIPO DE PROTECCION PERSONAL/ CONTROLES DE EXPOSICIÓN		
PROTECCION RESPIRATORIA: Con formacion de polvo. PROTECCION DE OJOS: Lentes de protección. MEDIDAS DE HIGIENE: Para la manipulación de productos quimicos atender las usuales normas de precaución y reglas de limpieza.		
4. MEDIDAS EN CASO DE VERTIDO ACCIDENTAL		
PRECAUCIONES INDIVIDUALES: Producto derramado genera con agua o humedad gran peligro resbalamiento. PRECAUCIONES PARA LA PROTECCION DEL MEDIO AMBIENTE: Remover con un material absorbente. Lavar y enviar los pequeños restos al sistema de canalización con mucho agua y adicionar al tratamiento biologico de aguas servidas.		
5. MANIPULACION Y ALMACENAMIENTO		
MANIPULACIÓN: Advertencia para la manipulación segura: Antes de generación de polvo, asegurar una buena ventilación, eventualmente aspiración. ALMACENAMIENTO: Exigencias técnicas para almacenes y recipientes: Medidas especiales no son necesarias.		
6. INFORMACIONES ECOLOGICAS.		
Informaciones sobre eliminacion (permanencia y degradabilidad). Biodegradabilidad: No permitir que el producto concentrado alcance las vías de agua sin un tratamiento biologico de las aguas servidas. Las soluciones diluidas de aplicación especifica deben ser consideradas como no contaminantes del agua, motivado por las características especificas del producto (sustantividad elevada, floculación con lodos activos). De acuerdo a su estructura altamente polimerizada no se presenta un valor apreciable de degradación biologica. Por la sustentividad propia del producto se alcanza un alto grado de eliminación en instalaciones biologicas de depuración de aguas servidas, ya que se fija a los lodos activos.		
7. CONSIDERACIONES SOBRE LA ELIMINACIÓN		
PRODUCTO: Desechar según las prescripciones de las autoridades locales, como por ejem, en una adecuada instalación de incineración. ENVASES CONTAMINADOS: Embalajes no dañados pueden ser, luego de una limpieza adecuada, nuevamente utilizados bajo responsabilidad propia.		

APROBÓ: MAURICIO BELTRÁN CAMARGO

FECHA: OCTUBRE 27 DE 2006

Anexo II. Caracterización de agua residual de la Planta Base Agua de Compañía Global de Pinturas.

1. Información del Usuario.

Cliente: COMPAÑÍA PINTUCO S.A.
Solicitado por: Ingeniero Sergio Uribe
Dirección: Autopista Medellín Bogota, Km. 1 Vía Belén rionegro
Fecha de Reporte: 16 de julio de 2007

2. Identificación de las Muestras Recibidas

Fecha de Recepción:	05 de Julio de 2007	Hora:	Puntual
Muestreado por:	Omniambiente Ltda.		
Código	Descripción de la Muestras	Matriz	Características
2886-01	Entrada P. T. A. Residual Industrial	Agua	A. Residual
2886-02	Salida P.T.A. Residual Industrial	Agua	A. Residual

3. Análisis de Laboratorio

Resultados Pruebas Fisicoquímicas

Parámetros	Unidades	Valores Obtenidos	
		2886-01	2886-02
DQO	mg/l O ₂	2784	784
DBO ₅	mg/l O ₂	1920	540
Sólidos Suspendidos	mg/l	2439	250

Metodologías de Análisis

DQO	5320D – Reflujo cerrado – Método Calorimétrico
DBO₅	5210B – Prueba ROB de 5 días
Sólidos Suspendidos	2540D – Sólidos Totales en suspensión secados a 103-105 °C.

4. Confidencialidad

Los resultados anteriores son validos únicamente para las muestras analizadas en el laboratorio, y son de carácter confidencial y de propiedad del cliente.

Ana Maria Alzate Montes

Anexo III. Decreto 1594 de 1984 (normatividad de efluentes)

PARAGRAFO. De acuerdo con las características del cuerpo receptor y del vertimiento, la EMAR decidirá cual o cuales de las normas de control de vertimiento señaladas en este artículo podrán excluirse.

ARTICULO 73. Todo vertimiento a un alcantarillado público deberá cumplir, por lo menos, con las siguientes normas:

REFERENCIA	VALOR		
pH	5 a 9 unidades		
Temperatura	<40° C		
Acidos, bases o soluciones ácidas o básicas que puedan causar contaminación; sustancias explosivas o inflamables	Ausentes		
Sólidos sedimentables	< 10 ml / l		
Sustancias solubles en hexano	< 100 mg / l		
Sólidos suspendidos para desechos domésticos e industriales	USUARIO EXISTENTE Remoción > 50 % en carga	USUARIO NUEVO Remoción >80% en carga.	
DEMANDA BIOQUIMICA DE OXIGENO			
Para desechos domésticos	Remoción >30% en carga	Remoción >80% en carga	
Para desechos industriales	Remoción >20% en carga	Remoción >80% en carga	
Caudal máximo	1.5 veces el caudal promedio horario		

Carga máxima permisible (CMP) de acuerdo a lo establecido en los artículo 74 y 75 del presente Decreto.

PARAGRAFO. De acuerdo con las características del cuerpo receptor y del vertimiento, la EMAR decidirá cual o cuales de las normas de control de vertimiento anotadas, podrán excluirse.

ARTICULO 74. Las concentraciones para el control de la carga de las siguientes sustancias de interés sanitario, son:

SUSTANCIA (mg/l)	EXPRESADA COMO	CONCENTRACIÓN
Arsénico	As	0.5
Bario	Ba	5.0
Cadmio	Cd	0.1
Cobre	Cu	3.0
Cromo	Cr + 6	0.5
Compuestos fenólicos	Fenol	0.2
Mercurio	Hg	0.02
Níquel	Ni	2.0
Plata	Ag	0.5
Plomo	Pb	0.5
Selenio	Se	0.5
Cianuro	CN	1.0
Difenil policlorados	Concentración de Agente Activo	No detectable

Mercurio orgánico	Hg	No detectable
Tricloroetileno	Tricloroetileno	1.0
Cloroformo	Extracto carbón	
	Cloroformo (ECC)	1.0
Tetracloruro de Carbono	Tetracloruro de Carbono	1.0
Dicloroetileno	Dicloroetileno	1.0
Sulfuro de Carbono	Sulfuro de Carbono	1.0
Otros compuestos organoclorados cada variedad	Concentración de Agente Activo	0.5
Compuestos organofosforados, cada variedad	Concentración de Agente Activo	0.1
Carbamatos	-	0.1

PARAGRAFO. Cuando los usuarios, aún cumpliendo con las normas de vertimiento, produzcan concentraciones en el cuerpo receptor que excedan los criterios de calidad para el uso de usos asignados al recurso, el Ministerio de Salud o las EMAR podrán exigirles valores más restrictivos en el vertimiento.

ARTICULO 75. La carga de control de un vertimiento que contenga las sustancias de que trata el artículo anterior, se calculará mediante la aplicación de las siguientes ecuaciones:

$$A = (Q) (CDC) (0.0864)$$

$$B = (Q) (CV) (0.0864)$$

PARAGRAFO 1. Para los efectos de las ecuaciones a que se refiere el presente artículo, adoptanse las siguientes convenciones:

A : Carga de control, Kg/día

Q : Caudal promedio de vertimiento, l/seg.

B : Carga en el vertimiento kg/día

CDC: Concentración de control, mg/l

CV : Concentración en el vertimiento, mg/l

0.0861: Factor de conversión.

PARAGRAFO 2. La carga máxima permisible (CMP) será menor de los valores entre A y B.

ARTICULO 76. Cuando la carga real en el vertimiento sea mayor que la carga máxima permisible (CMP), aquella se deberá reducir en condiciones que no sobrepase la carga máxima permisible.

ARTICULO 77. Cuando el caudal promedio del vertimiento se reduzca y por consiguiente la concentración de cualesquiera de las sustancias previstas en el artículo 74 se aumente, la carga máxima permisible (CMP) continuará siendo la fijada según el parágrafo 2 del artículo 75 del presente Decreto.

ARTICULO 78. El control del pH, Temperatura (T), Material Flotante, Sólidos Sedimentables, caudal y sustancias solubles en hexano, en el vertimiento, se hará con base en unidades y en concentración. El de los sólidos suspendidos y el de la Demanda Bioquímica de Oxígeno, con base en la carga máxima permisible, (CMP) de acuerdo con las regulaciones que establezca la EMAR.

ARTICULO 79. Las normas de vertimiento correspondientes a las ampliaciones que hagan los usuarios del recurso se calcularán de acuerdo con lo establecido en los artículos 75, 76, 77 y 78 del presente Decreto.

Anexo IV. Protocolo de Tinción de Gram.

Esta tinción sirve para diferenciar las bacterias Gram. positivas y las bacterias Gram. negativas. Las bacterias Gram. positivas mediante este método, quedan de un color azul violeta y las bacterias Gram. negativas quedan de un color rojizo.

Procedimiento:

- Se tomo una pequeña muestra de la bacteria a colorear y se fija a la placa.
- Se coloca la placa sobre el puente de coloración.
- Se agregan a la placa varias gotas de Cristal Violeta hasta que la muestra de bacteria quede completamente cubierta y se deja reposar por un minuto.
- Lavar la placa con agua, con la precaución de no exponer directamente el extendido.
- Agregar varias gotas de Lugol con el fin de fijar el cristal violeta y dejar reposar por un minuto
- Lavar con agua.
- Agregar Alcohol Cetona sobre la muestra y dejar reposar por 30 segundos.
- Lavar con agua.

- Agregar varias gotas de Safranina sobre la muestra y dejar reposar por un minuto.
- Lavar con agua.
- Secar la muestra.
- Observar la muestra en el microscopio.

(Becerra, 2007).

Anexo V. Análisis estadístico por Statgraphics 5.1 para los ensayos preliminares con 1 g/l de caldo nutritivo.

1. Formación de biomasa

Dependent variable: OD

Factor: Cepa

Number of observations: 10

Number of levels: 5

ANOVA Table for OD by Cepa

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0,764429	4	0,191107	24,45	0,0018
Within groups	0,039082	5	0,0078164		
Total (Corr.)	0,803511	9			

Multiple Range Tests for D0 by Cepa

Method: 95,0 percent LSD

Cepa	Count	Mean	Homogeneous Groups
5	2	0,69275	X
1	2	1,29125	X
3	2	1,37675	X
4	2	1,39425	X
7	2	1,434	X

Contrast	Difference	+/- Limits
1 - 3	-0,0855	0,227267
1 - 4	-0,103	0,227267
1 - 5	*0,5985	0,227267
1 - 7	-0,14275	0,227267
3 - 4	-0,0175	0,227267
3 - 5	*0,684	0,227267
3 - 7	-0,05725	0,227267
4 - 5	*0,7015	0,227267
4 - 7	-0,03975	0,227267
5 - 7	*-0,74125	0,227267

* denotes a statistically significant difference.

2. Velocidad especifica de crecimiento

Dependent variable: Ux

Factor: CEPA

Number of observations: 10

Number of levels: 5

ANOVA Table for ux by Cepa

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0.0456742	4	0.0114185	30.94	0.0010
Within groups	0.00184528	5	0.000369055		
Total (Corr.)	0.0475194	9			

Multiple Range Tests for ux by Cepa

Method: 95,0 percent LSD

Cepa	Count	Mean	Homogeneous Groups
4	2	0,0705	X
3	2	0,0768	XX
1	2	0,08695	XX
7	2	0,12045	X
5	2	0,25205	X

Contrast	Difference	+/- Limits
1 - 3	0,01015	0,0493831
1 - 4	0,01645	0,0493831
1 - 5	*-0,1651	0,0493831
1 - 7	-0,0335	0,0493831
3 - 4	0,0063	0,0493831
3 - 5	*-0,17525	0,0493831
3 - 7	-0,04365	0,0493831
4 - 5	*-0,18155	0,0493831
4 - 7	*-0,04995	0,0493831
5 - 7	*0,1316	0,0493831

* denotes a statistically significant difference.

3. Reducción de la DQO

Analysis Summary

Dependent variable: reducción

Factor: cepa

Number of observations: 10

Number of levels: 5

ANOVA Table for Reduccion DQO by Ceba

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	1572,99	4	393,248	29,89	0,0011
Within groups	65,7781	5	13,1556		
Total (Corr.)	1638,77	9			

Multiple Range Tests for Reduccion DQO by Ceba

Method: 95,0 percent LSD			
Ceba	Count	Mean	Homogeneous Groups
5	2	23,35	X
4	2	31,6529	XX
3	2	33,168	X
7	2	49,895	X
1	2	57,3005	X

Contrast	Difference	+/- Limits
1 - 3	*24,1325	9,3237
1 - 4	*25,6476	9,3237
1 - 5	*33,9505	9,3237
1 - 7	7,40548	9,3237
3 - 4	1,51515	9,3237
3 - 5	*9,81801	9,3237
3 - 7	*-16,727	9,3237
4 - 5	8,30287	9,3237
4 - 7	*-18,2421	9,3237
5 - 7	*-26,545	9,3237

* denotes a statistically significant difference.

--

Anexo VI. Análisis estadístico por Statgraphics 5.1 para el proceso con Adaptación.

1. Formación de biomasa: .

1.1 comparación entre las diferentes concentraciones de las cinéticas de adaptación:

Analysis Summary

Dependent variable: DO

Factors:

Cepa

Concentración

Number of complete cases: 64

Analysis of Variance for Absorbancia - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:Concetracion	7,11043	3	2,37014	394,59	0,0000
B:Cepa	0,657654	3	0,219218	36,50	0,0000
INTERACTIONS					
AB	1,43902	9	0,159891	26,62	0,0000
RESIDUAL	0,288319	48	0,00600664		
TOTAL (CORRECTED)	9,49543	63			

Multiple Range Tests for Absorbancia by Concetracion

Method: 95,0 percent LSD

Concetracion	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
0	16	0,157625	0,0193756	X
0,3	16	0,322344	0,0193756	X
0,6	16	0,551937	0,0193756	X
1	16	1,0425	0,0193756	X

Contrast	Difference	+/- Limits
0 - 0,3	*-0,164719	0,0550941
0 - 0,6	*-0,394312	0,0550941
0 - 1	*-0,884875	0,0550941
0,3 - 0,6	*-0,229594	0,0550941
0,3 - 1	*-0,720156	0,0550941
0,6 - 1	*-0,490563	0,0550941

Multiple Range Tests for Absorbancia by Cepa

Method: 95,0 percent LSD

Cepa	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
7	16	0,388625	0,0193756	X
1	16	0,460906	0,0193756	X
4	16	0,572	0,0193756	X
3	16	0,652875	0,0193756	X

Contrast	Difference	+/- Limits
1 - 3	*-0,191969	0,0550941
1 - 4	*-0,111094	0,0550941
1 - 7	*0,0722812	0,0550941
3 - 4	*0,080875	0,0550941
3 - 7	*0,26425	0,0550941
4 - 7	*0,183375	0,0550941

1.2 comparación entre cepas adaptadas y sin adaptar a 0 g/L de caldo nutritivo:

Analysis Summary

Dependent variable: DO

Factors:

Adaptación

Cepa

Number of complete cases: 32

Analysis of Variance for Absorbancia - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:Concetracion	1,35836	1	1,35836	229,51	0,0000
B:Cepa	0,159738	3	0,0532459	9,00	0,0004
INTERACTIONS					
AB	0,462257	3	0,154086	26,03	0,0000
RESIDUAL	0,142046	24	0,00591859		
TOTAL (CORRECTED)	2,12241	31			

Multiple Range Tests for Absorbancia by Concetracion

Method: 95,0 percent LSD

Concetracion	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
0	16	0,157625	0,0192331	X
0 na	16	0,569687	0,0192331	X

Contrast	Difference	+/- Limits
0 - 0 na	*-0,412062	0,0561376

* denotes a statistically significant difference.

Multiple Range Tests for Absorbancia by Cepa

Method: 95,0 percent LSD

Cepa	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
3	8	0,267875	0,0271997	X
7	8	0,325875	0,0271997	X
1	8	0,4155	0,0271997	X
4	8	0,445375	0,0271997	X

Contrast	Difference	+/- Limits
1 - 3	*0,147625	0,0793905
1 - 4	-0,029875	0,0793905
1 - 7	*0,089625	0,0793905
3 - 4	*-0,1775	0,0793905
3 - 7	-0,058	0,0793905
4 - 7	*0,1195	0,0793905

* denotes a statistically significant difference.

2. Velocidad especifica de crecimiento (μ_x):

2.1 comparación entre las diferentes concentraciones de las cinéticas de adaptación:

Analysis Summary

Dependent variable: UX

Factors:

Cepa

Concentración

Number of complete cases: 64

Analysis of Variance for ux - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:Cepa	0,0100236	3	0,00334119	3,51	0,0222
B:Concetracion	0,107181	3	0,0357268	37,48	0,0000
INTERACTIONS					
AB	0,0417005	9	0,00463339	4,86	0,0001
RESIDUAL	0,0457562	48	0,000953255		
TOTAL (CORRECTED)	0,204661	63			

Multiple Range Tests for ux by Cepa

Method: 95,0 percent LSD

Cepa	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
1	16	0,06355	0,00771871	X
4	16	0,0648875	0,00771871	XX
7	16	0,0859987	0,00771871	XX
3	16	0,0917875	0,00771871	X

Contrast	Difference	+/- Limits
1 - 3	*-0,0282375	0,0219479
1 - 4	-0,0013375	0,0219479
1 - 7	*-0,0224488	0,0219479
3 - 4	*0,0269	0,0219479
3 - 7	0,00578875	0,0219479
4 - 7	-0,0211112	0,0219479

* denotes a statistically significant difference.

Multiple Range Tests for ux by Concetracion

Method: 95,0 percent LSD				
Concetracion	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
0	16	0,022225	0,00771871	X
0,3	16	0,0634	0,00771871	X
1	16	0,0848375	0,00771871	X
0,6	16	0,135761	0,00771871	X

Contrast	Difference	+/- Limits
0 - 0,3	*-0,041175	0,0219479
0 - 0,6	*-0,113536	0,0219479
0 - 1	*-0,0626125	0,0219479
0,3 - 0,6	*-0,0723613	0,0219479
0,3 - 1	-0,0214375	0,0219479
0,6 - 1	*0,0509237	0,0219479

* denotes a statistically significant difference.

2.2 Comparación entre cepas adaptadas y sin adaptar a 0 g/L de caldo nutritivo:

Analysis Summary

Dependent variable: ux

Factors:

Concentración

Cepa

Number of complete cases: 32

Analysis of Variance for ux - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:Concetracion	0,000521645	1	0,000521645	7,73	0,0104
B:Cepa	0,00306825	3	0,00102275	15,16	0,0000
INTERACTIONS					
AB	0,00980966	3	0,00326989	48,48	0,0000
RESIDUAL	0,00161888	24	0,0000674533		
TOTAL (CORRECTED)	0,0150184	31			

Multiple Range Tests for ux by Concetracion

Method: 95,0 percent LSD				
Concetracion	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
0	16	0,022225	0,00205325	X
0 na	16	0,0303	0,00205325	X
Contrast			Difference	+/- Limits
0 - 0 na			*-0,008075	0,00599302

* denotes a statistically significant difference.

Multiple Range Tests for ux by Cepa

Method: 95,0 percent LSD				
Cepa	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
3	8	0,019125	0,00290373	X
4	8	0,020175	0,00290373	X
1	8	0,022675	0,00290373	X
7	8	0,043075	0,00290373	X
Contrast			Difference	+/- Limits
1 - 3			0,00355	0,00847541
1 - 4			0,0025	0,00847541
1 - 7			*-0,0204	0,00847541
3 - 4			-0,00105	0,00847541
3 - 7			*-0,02395	0,00847541
4 - 7			*-0,0229	0,00847541

* denotes a statistically significant difference.

3. Reducción de la DQO:

3.1 comparación entre las diferentes concentraciones de las cinéticas de adaptación:

Analysis Summary

Dependent variable: Reducción DQO

Factors:

Cepa

Concentración

Number of complete cases: 64

Analysis of Variance for Reduccion DQO - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:Concetracion	3008,05	3	1002,68	16,10	0,0000
B:Cepa	3745,03	3	1248,34	20,05	0,0000
INTERACTIONS					
AB	9735,82	9	1081,76	17,37	0,0000
RESIDUAL	2988,97	48	62,2703		
TOTAL (CORRECTED)	19477,9	63			

Multiple Range Tests for Reduccion DQO by Concetracion

Method: 95,0 percent LSD

Concetracion	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
0,6	16	21,5594	1,97279	X
0	16	31,7506	1,97279	X
0,3	16	35,1019	1,97279	XX
1	16	40,3338	1,97279	X

Contrast	Difference	+/- Limits
0 - 0,3	-3,35125	5,60957
0 - 0,6	*10,1913	5,60957
0 - 1	*-8,58313	5,60957
0,3 - 0,6	*13,5425	5,60957
0,3 - 1	-5,23188	5,60957
0,6 - 1	*-18,7744	5,60957

Multiple Range Tests for Reduccion DQO by Cepa

Method: 95,0 percent LSD

Cepa	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
4	16	24,1325	1,97279	X
7	16	27,4269	1,97279	XX
1	16	32,9162	1,97279	X
3	16	44,27	1,97279	X

Contrast	Difference	+/- Limits
1 - 3	*-11,3537	5,60957
1 - 4	*8,78375	5,60957
1 - 7	5,48938	5,60957
3 - 4	*20,1375	5,60957
3 - 7	*16,8431	5,60957
4 - 7	-3,29437	5,60957

3.2 Comparación entre cepas adaptadas y sin adaptar a 0 g/L de caldo nutritivo:

Analysis Summary

Dependent variable: Reducción DQO

Factors:

Cepa

Adaptación

Number of complete cases: 32

Analysis of Variance for Reduccion DQO - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:Concetracion	369,784	1	369,784	4,86	0,0374
B:Cepa	281,531	3	93,8436	1,23	0,3197
INTERACTIONS					
AB	5166,28	3	1722,09	22,62	0,0000
RESIDUAL	1827,46	24	76,1442		
TOTAL (CORRECTED)	7645,06	31			

Multiple Range Tests for Reduccion DQO by Concetracion

Method: 95,0 percent LSD

Concetracion	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
0	16	31,7506	2,18152	X
0 na	16	38,5494	2,18152	X

Contrast	Difference	+/- Limits
0 - 0 na	*-6,79875	6,36741

* denotes a statistically significant difference.

Anexo VII. Análisis estadístico por Statgraphics 5.1 para el proceso con Consorcios.

1. Formación de biomasa: _

Analysis Summary

Dependent variable: DO

Factor: consorcios

Number of observations: 16

Number of levels: 4

ANOVA Table for DO by Consorcio

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0,011345	3	0,00378167	2,71	0,0918
Within groups	0,01675	12	0,00139583		
Total (Corr.)	0,028095	15			

2. Velocidad especifica de crecimiento: .

Analysis Summary

Dependent variable: ux

Factor: Consorcio

Number of observations: 16

Number of levels: 4

ANOVA Table for ux by Consorcio

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0,00272648	3	0,000908827	132,74	0,0000
Within groups	0,00008216	120	0,0000684667		
Total (Corr.)	0,00280864	15			

Multiple Range Tests for ux by Consorcio

Method: 95,0 percent LSD			
Consorcio	Count	Mean	Homogeneous Groups
comercial	4	0,0222	X
7	4	0,0271	X
1,4,7	4	0,0453	X
1,4	4	0,0542	X

Contrast	Difference	+/- Limits
1,4 - 1,4,7	*0,0089	0,0040313
1,4 - 7	*0,0271	0,0040313
1,4 - comercial	*0,032	0,0040313
1,4,7 - 7	*0,0182	0,0040313
1,4,7 - comercial	*0,0231	0,0040313
7 - comercial	*0,0049	0,0040313

* denotes a statistically significant difference.

3. Porcentaje de reducción de la DQO:

Analysis Summary

Dependent variable: reducción DQO

Factor: consorcio

Number of observations: 16

Number of levels: 4

ANOVA Table for Reduccion DQO by Consorcio

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	6218,62	3	2072,87	39,94	0,0000
Within groups	622,762	12	51,8968		
Total (Corr.)	6841,38	15			

Multiple Range Tests for Reduccion DQO by Consorcio

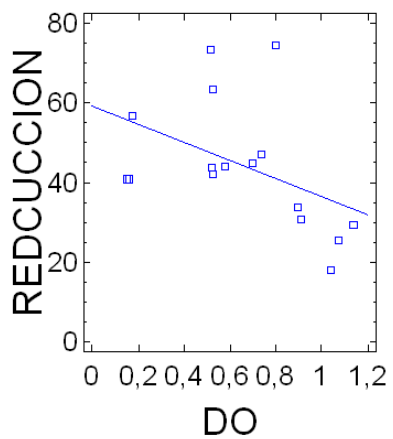
Method: 95,0 percent LSD			
Consorcio	Count	Mean	Homogeneous Groups
1,4,7	4	15,834	X
1,4	4	45,5997	X
7	4	49,66	X
comercial	4	71,1375	X

Contrast	Difference	+/- Limits
1,4 - 1,4,7	*29,7657	11,0988
1,4 - 7	-4,06025	11,0988
1,4 - comercial	*-25,5378	11,0988
1,4,7 - 7	*-33,826	11,0988
1,4,7 - comercial	*-55,3035	11,0988
7 - comercial	*-21,4775	11,0988

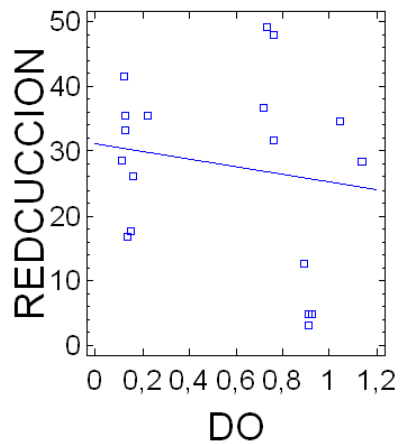
* denotes a statistically significant difference.

Anexo VIII. Linealización Reducción DQO vs. Densidad Óptica para las cepa 3, 4 y 7.

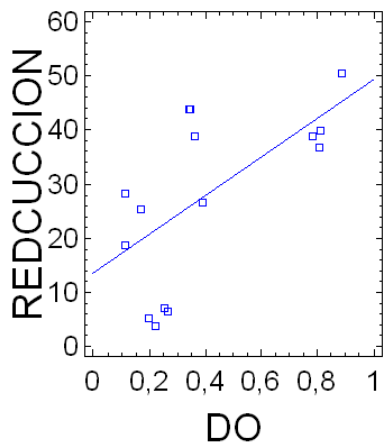
Cepa 3



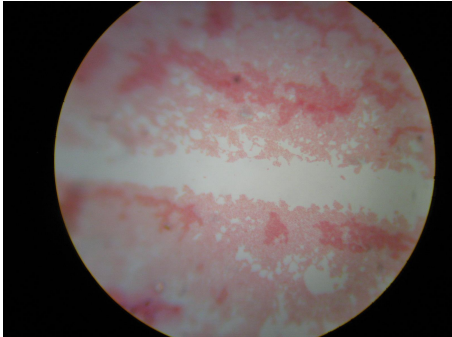
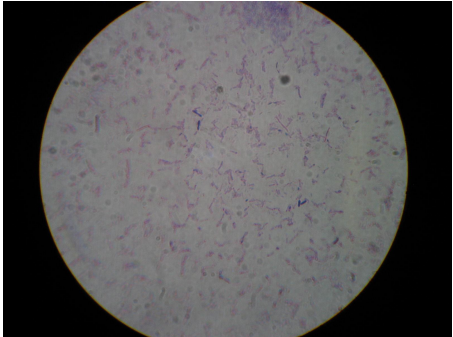
Cepa 4



Cepa 7

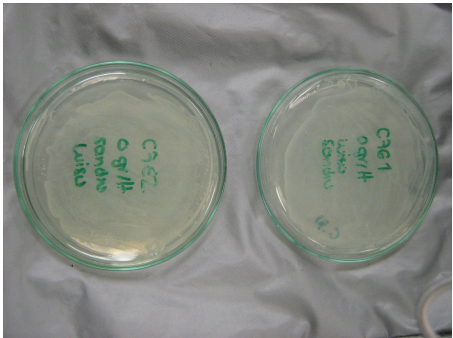


Anexo XI. Fotografías



Tinción de Gram consorcio

Tinción de Gram cepa 7

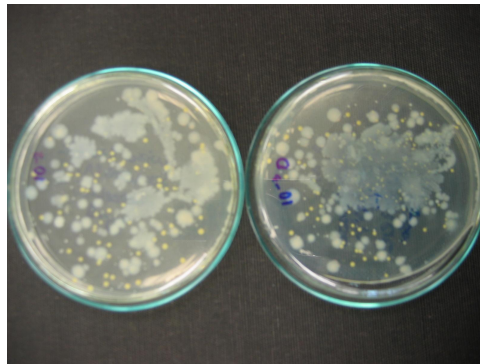
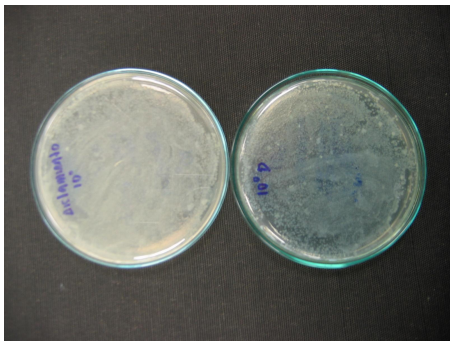


Cajas Petri con cepa 7

Cultivos líquidos. Ensayo preliminar

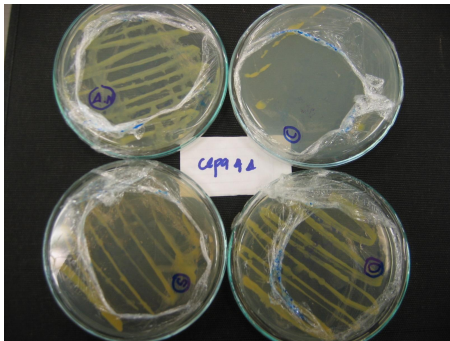


Cepa 4. Cultivo Líquido Adaptación.



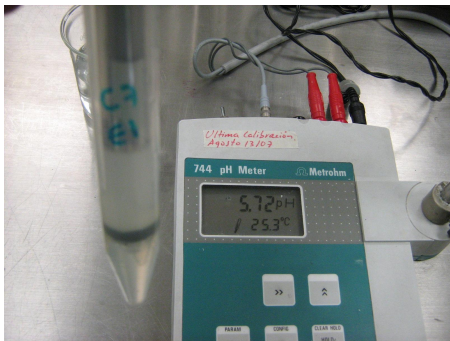
Aislamiento dilución 10^0 .

Aislamiento dilución 10^{-3} .



Cepa 4 en medios selectivos

Preinóculo cepa 4.



Medición de pH Cepa 7.