

**EVALUACIÓN DE LA BIODEGRADACIÓN COMO ALTERNATIVA PARA
EL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES DE UNA TINTORERÍA Y
LAVANDERÍA**

ANA MARÍA GALEANO SÁNCHEZ

LUKAS OSORIO GONZÁLEZ

**UNIVERSIDAD EAFIT
ESCUELA DE INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA DE PROCESOS
MEDELLÍN
2008**

**EVALUACIÓN DE LA BIODEGRADACIÓN COMO ALTERNATIVA PARA
EL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES DE UNA TINTORERÍA Y
LAVANDERÍA**

ANA MARÍA GALEANO SÁNCHEZ

LUKAS OSORIO GONZÁLEZ

Asesor:

M.Sc. CATALINA GIRALDO ESTRADA

**Trabajo de investigación presentado para optar al título de Ingeniero de
Procesos**

**UNIVERSIDAD EAFIT
ESCUELA DE INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA DE PROCESOS
MEDELLÍN
2008**

“La oscuridad nos envuelve a todos, pero mientras el sabio tropieza en alguna pared, el ignorante permanece tranquilo en el centro de la estancia.”

-Anatole France-

El camino de la formación está lleno de imprevistos, dificultades y desafíos. Cada persona tiene, en sus propios términos, las facultades para resolverlos. Sin embargo, en ocasiones, se vienen tantos al mismo tiempo y con tanta fuerza que se precisa de la mano amiga para resolverlos. Es ahí donde nuestros maestros, compañeros y familiares han marcado la pauta dentro de nuestra formación, extendiéndonos desinteresadamente su apoyo, comprensión y cariño en esta difícil tarea de dar lo mejor de nosotros mismos. Para todos ellos nuestro más sincero agradecimiento e inquebrantable deseo de nunca dejar de satisfacer todo aquello que esperan de nosotros.

AGRADECIMIENTOS

CATALINA GIRALDO ESTRADA, Docente del Departamento de Ingeniería de Procesos, por su asesoría en el proyecto, por su apoyo incondicional en todo este tiempo y por estar siempre dispuesta a colaborarnos.

SIGIFREDO CÁRDENAS, Auxiliar de laboratorio de Biotecnología, por toda la colaboración prestada en el laboratorio de Biotecnología, su asesoría y apoyo en el proyecto.

EDGAR DARIO ARBELÁEZ, Coordinador de los laboratorios de Ingeniería de Procesos de la Universidad EAFIT, por su colaboración en el desarrollo del proyecto.

MAURICIO LONDOÑO y JOHN JAIRO ESTRADA, Auxiliares de los laboratorios de Ingeniería de Procesos.

GUSTAVO GALEANO HENAO, Gerente de la empresa del sector textil, que apoyó incondicionalmente el estudio y desarrollo del proyecto, quien además estuvo atento a todas nuestras necesidades.

LUISA FERNANDA POSADA URIBE, Ingeniera de Procesos de la universidad EAFIT, por su desinteresado apoyo y colaboración en el desarrollo del proyecto.

Nota de aceptación

Presidente del jurado

Jurado

Jurado

Ciudad y Fecha (día, mes, año)

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	1
1. OBJETIVOS.....	4
1.1 GENERAL.....	4
1.2 ESPECÍFICOS.....	4
2. MARCO TEÓRICO.....	6
2.1 CARACTERÍSTICAS DE LAS AGUAS RESIDUALES.....	6
2.1.1 Características físicas.....	7
2.1.1.1 Sólidos totales.....	7
2.1.1.2 Olores.....	7
2.1.1.3 Temperatura.....	7
2.1.1.4 Color.....	8
2.1.2 Características químicas orgánicas.....	8
2.1.2.1 Medida del contenido orgánico.....	9
2.1.2.2 Demanda Química de Oxígeno.....	9
2.1.3 Características químicas inorgánicas.....	9
2.1.3.1 pH.....	9
2.1.3.2 Cloruros.....	10
2.1.3.3 Metales pesados.....	10
2.1.4 Características biológicas.....	10
2.1.4.1 Microorganismos.....	10
2.2 NORMATIVIDAD.....	10
2.2.1 Artículo 72.....	11
2.2.2 Artículo 73.....	11
2.3.1 Ventajas y desventajas de la biodegradación.....	13
2.3.1.1 Ventajas:.....	13
2.3.1.2 Desventajas:.....	13
2.3.2 Diseño de los medios de cultivo.....	13
2.3.2.1 Aporte de nutrientes.....	14
2.3.2.2 pH.....	14
2.3.2.3 Control de la temperatura.....	14
2.3.3 Papel de los microorganismos.....	14
2.3.3.1 Hongos.....	15
2.3.3.2 Levaduras.....	15
2.3.3.2.1 <i>Rodhotorula mucilaginosa</i>	17

2.3.4 Adaptación microbiana	18
2.3.5 Cinética microbiana	18
2.3.6 Pruebas bioquímicas para la identificación de microorganismos..	21
2.3.6.1 Tinción de gram.....	21
2.3.6.2 Prueba de la oxidasa.....	22
2.3.6.3 Prueba de la catalasa.....	22
2.3.6.4 Agar King A y King B.....	23
2.3.6.5 Agar Cetrimide	23
2.4 DISEÑO CONCEPTUAL	23
2.5 ANTECEDENTES RELACIONADOS CON TRATAMIENTOS BIOLÓGICOS USANDO MICROORGANISMOS	24
3. METODOLOGÍA	28
3.1 MATERIALES Y EQUIPOS	28
3.1.1 Reactivos	28
3.1.2 Materiales y Equipos.....	29
3.2 MICROORGANISMOS.....	30
3.3 ENSAYOS PRELIMINARES PARA EL AGUA RESIDUAL	30
3.4 MEDIOS DE CULTIVO.....	31
3.5 AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS.....	32
3.5.1 Método de la dilución en serie	32
3.5.2 Sembrado en superficie	33
3.6 PRESERVACIÓN DE LAS CEPAS AISLADAS.....	34
3.7 PROCEDIMIENTOS MICROBIOLÓGICOS PARA IDENTIFICACIÓN PRELIMINAR	34
3.7.1 Tinción de Gram	34
3.7.2 Prueba de la catalasa	35
3.7.3 Prueba de la oxidasa	35
3.7.4 Siembra en agar F, agar P y Cetrimide.....	35
3.8 TÉCNICAS ANALÍTICAS UTILIZADAS EN EL PROYECTO	36
3.8.1 Método de Lowry para determinación de proteínas.....	36
3.8.2 Medición de DQO	36
3.9 ADAPTACIÓN Y SELECCIÓN DE MICROORGANISMOS.....	37
3.9.1 Ensayos de adaptación de cepas microbianas.....	37
3.9.2 Selección de microorganismos	39
3.10 ENSAYO DE ESTERILIDAD	40
3.11 CINÉTICAS DE DEGRADACIÓN PLANTEADAS	40
3.11.1 Cinética para el ensayo de esterilidad	40
3.11.2 Cinética para la selección del microorganismo.....	40
3.11.3 Cinéticas para el mejoramiento del medio de cultivo	41
3.13 DISEÑOS DE EXPERIMENTOS PLANTEADOS.....	42
3.13.1 Diseño de experimentos para escogencia de los microorganismos y pretratamiento con o sin esterilización	42

3.13.2	Diseño de experimentos para elegir el microorganismo de estudio y pretratamiento con o sin esterilización	42
3.13.3	Diseño de experimentos para el mejoramiento de la concentración de glucosa y velocidad de agitación	43
3.13.4	Diseño de experimentos para el mejoramiento de la concentración de peptona.....	43
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
4.1	ENSAYOS PRELIMINARES PARA EL AGUA RESIDUAL	44
4.1.1	Ensayo de esterilización	44
4.1.2	Ensayo para verificar cambios tras autoclavado del agua	45
4.2	RESULTADOS DEL AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS.....	47
4.3	RESULTADOS DE LOS PROCEDIMIENTOS MICROBIOLÓGICOS DE IDENTIFICACIÓN PRELIMINAR.....	50
4.3.1	Tinción de Gram	51
4.3.2	Prueba de Oxidasa y Catalasa	52
4.3.3	Siembra en agar P, agar F y cetrimide	53
4.4	ADAPTACIÓN DE MICROORGANISMOS AL AGUA RESIDUAL	53
4.5	RESULTADOS DEL ENSAYO DEL BLANCO DE BIODEGRADACIÓN	56
4.6	ANÁLISIS DE LA DEGRADACIÓN DE COLOR.....	57
5.	DISEÑO DE EXPERIMENTOS.....	59
5.1	CINÉTICAS DE DEGRADACIÓN Y CINÉTICAS DE CRECIMIENTO	59
5.2	FACTORES BAJO ESTUDIO.....	59
5.2.1	Niveles del factor	60
5.2.2	Variables de respuesta	61
5.2.2.1	Unidad experimental	61
5.2.2.2	Descripción	61
5.3	HIPÓTESIS	61
5.3.1	Hipótesis nula (H0)	61
5.3.2	Hipótesis alterna (Ha)	62
5.4	EFFECTO DEL TIPO DE MICROORGANISMO (CEPA 16, 18, 19 Y 20) Y DEL PRETRATAMIENTO SOBRE LA BIODEGRADACIÓN.	62
5.4.1	Efecto del tipo de microorganismo sobre el tratamiento de biodegradación	62
5.4.2	Efecto del tipo de pretratamiento sobre el tratamiento de biodegradación	64
5.5	EFFECTO DEL TIPO DE MICROORGANISMO (AISLAMIENTO 16 Y 19) Y DEL PRETRATAMIENTO SOBRE LA BIODEGRADACIÓN.	67
5.5.1	Efecto del tipo de microorganismo sobre el tratamiento de biodegradación	67
5.5.2	Efecto del tipo de pretratamiento sobre el tratamiento de biodegradación	69

5.6 EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA Y DE LA VELOCIDAD DE AGITACIÓN SOBRE EL TRATAMIENTO DE BIODEGRADACIÓN Y EL CRECIMIENTO CELULAR.	71
5.6.1 Efecto de la concentración de glucosa sobre el tratamiento de biodegradación	71
5.6.2 Efecto de la concentración de glucosa sobre la concentración de proteína celular	76
5.6.3 Efecto de la velocidad de agitación sobre el tratamiento de biodegradación	78
5.6.4 Efecto de la velocidad de agitación sobre la concentración de proteína celular	79
5.7 EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE PEPTONA SOBRE EL TRATAMIENTO DE BIODEGRADACIÓN Y EL CRECIMIENTO CELULAR	81
5.7.1 Efecto de la concentración de peptona sobre el tratamiento de biodegradación	81
5.7.2 Efecto de la concentración de peptona sobre la concentración de proteína celular	84
5.9 DECISIÓN FINAL	86
6. DISEÑO BASICO DE LA PLANTA DE TRATAMIENTO	88
6.1 DIAGRAMAS DE PROCESO	88
6.1.1 Diagrama general de entradas y salidas.....	88
6.1.2 Diagrama genérico de bloques GBFD	88
6.1.3 Diagrama de bloques de proceso BFD	89
6.1.4 Diagrama de flujo preliminar del proceso PFD	90
6.2 SELECCIÓN DE OPERACIONES UNITARIAS Y SELECCIÓN DE EQUIPOS	91
6.2.1 Bombas.....	91
6.2.2 Tanques.....	92
6.3 BALANCES DE MASA Y ENERGÍA.....	93
6.3.1 Balances de masa y energía para las bombas	93
6.3.2 Balances de masa y energía para los Tanques.....	94
6.4 DISEÑO DE EQUIPOS	95
6.4.1 Tanques.....	95
6.4.1.1 Diámetro.....	95
6.4.1.2 Altura.....	96
6.4.1.3 Espesor de Pared.....	96
6.4.1.4 Tiempo de Residencia.....	96
6.4.1.5 Material de construcción	97
6.4.1.6 Disposición	97
6.4.2 Bombas.....	98
6.4.2.1 Tipo de Bomba.....	98
6.4.2.2 Material de Construcción.....	98

7. ESTUDIO ECONÓMICO.....	99
7.1 INVERSIONES FIJAS	99
7.1.2 Construcciones y Obras Civiles	99
7.1.3 Maquinaria y Equipo	99
7.2 INVERSIONES DIFERIDAS.....	100
7.2.1 Estudios	100
7.2.2 Gastos de Montaje y Puesta en Marcha	100
7.2.3 Capacitación	100
7.2.4 Otros e Imprevistos.....	101
7.3 CAPITAL DE TRABAJO	101
7.4 COSTOS DE OPERACIÓN	102
7.4.1 Materia Prima	102
7.4.2 Mano de Obra Directa y Prestaciones	103
7.4.3 Servicios, Mantenimiento, Seguros, Impuestos	103
7.5 INGRESOS	104
7.6 ESTIMACIÓN DE FLUJOS DE EFECTIVO.....	104
7.7 EVALUACIÓN FINANCIERA.....	105
7.7.1 Indicadores de Rentabilidad	106
7.7.2 Estudio de Sensibilidad.....	107
7.7.3 Riesgo.....	109
8. CONCLUSIONES	111
9. RECOMENDACIONES	114
10. BIBLIOGRAFÍA	115

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Características Físicas, Químicas y Biológicas del agua residual y su procedencia.....	6
Tabla 2. Parámetros de la norma para el artículo 72 (Decreto 1594,1984) (Minambiente, 2006).....	11
Tabla 3. Parámetros de la norma para el artículo 73 (Decreto 1594,1984) (Minambiente, 2006).....	11
Tabla 4. Algunos procesos biológicos utilizados en el tratamiento del agua residual	12
Tabla 5. Ensayos de adaptación en cultivo sólido	38
Tabla 6. Ensayos de adaptación para siembra en líquido.	39
Tabla 7. Resultados de los ensayos iniciales para el agua residual.....	44
Tabla 8. Resultados de algunas características morfológicas y de crecimiento de los aislamientos obtenidos.....	47
Tabla 9. Microorganismos aislados en el proceso	49
Tabla 10. Resultados de la Tinción de Gram para los microorganismos aislados.....	51
Tabla 11. Resultados de las pruebas de Oxidasa y Catalasa para las cepas descritas	52
Tabla 12. Resultados de proceso de adaptación en sólido.....	54
Tabla 13. Resultados del proceso de adaptación en líquido.....	55
Tabla 14. Condiciones para los Diseños de experimentos.	60

Tabla 15. ANOVA para la disminución de la DQO por tipo de Microorganismo.	62
Tabla 16. Test de Rangos Múltiples para la disminución en la DQO por tipo de Microorganismo	63
Tabla 17. Tabla resumen para el porcentaje de remoción de la DQO variando microorganismo y pretratamiento.....	63
Tabla 18. ANOVA para la disminución de la DQO por tipo de Pretratamiento.	64
Tabla 19. Test de Rangos Múltiples para la disminución en la DQO por tipo de Pretratamiento	65
Tabla 20. ANOVA para la disminución en la DQO por tipo de Microorganismo.	67
Tabla 21. Test de Rangos Múltiples para la disminución en la DQO por tipo de Microorganismo	67
Tabla 22. Tabla resumen para el porcentaje de remoción de la DQO variando microorganismo (16 y 19) y pretratamiento.	68
Tabla 23. ANOVA para la disminución en la DQO por tipo de Pretratamiento.	69
Tabla 24. Test de Rangos Múltiples para la disminución en la DQO por tipo de Pretratamiento	69
Tabla 25. ANOVA para Porcentaje de Remoción en la DQO por Concentración de Glucosa.....	72

Tabla 26. Test de Rangos Múltiples para Porcentaje de Remoción en la DQO por Concentración de Glucosa.....	72
Tabla 27. Tabla resumen para el porcentaje de remoción en la DQO variando concentración de glucosa y velocidad de agitación.	73
Tabla 28. ANOVA para Concentración de Proteína Celular por Concentración de Glucosa.....	76
Tabla 29. Test de Rangos Múltiples para Concentración de Proteína Celular por Concentración de Glucosa.....	77
Tabla 30. ANOVA para Porcentaje de Remoción en la DQO por Velocidad de Agitación.	78
Tabla 31. Test de Rangos Múltiples para Porcentaje de Remoción en la Demanda Química de Oxígeno por Velocidad de Agitación	78
Tabla 32. ANOVA para Concentración de Proteína Celular por Velocidad de Agitación.	79
Tabla 33. Test de Rangos Múltiples para Concentración de Proteína Celular por Velocidad de Agitación	80
Tabla 34. ANOVA para Porcentaje de Remoción en la DQO por Concentración de Peptona.	82
Tabla 35. Test de Rangos Múltiples para Porcentaje de Remoción en la DQO por Concentración de Peptona.	82
Tabla 36. Tabla resumen para el porcentaje de remoción de la DQO variando concentración de peptona.....	83

Tabla 37. ANOVA para Concentración de Proteína Celular por Concentración de Peptona.	84
Tabla 38. Test de Rangos Múltiples para Concentración de Proteína Celular por Concentración de Peptona.	84
Tabla 39. Condiciones finales del proceso de biodegradación	86
Tabla 40. Requerimientos energéticos para las bombas	94
Tabla 41. Resultados obtenidos para la altura, diámetro, tiempo de residencia y espesor de pared de los Vessel.....	97
Tabla 42. Depreciaciones y Amortización de Diferidos.....	99
Tabla 43. Rubros Capital de Trabajo	102
Tabla 44. Rubros Costo de Materia Prima.....	103
Tabla 45. Personal, Sueldos y Prestaciones	103
Tabla 46. Flujo de Efectivo para Proyecto Puro.....	105
Tabla 47. Resumen Indicadores de Rentabilidad, Valor de las cuotas y el total de interés para los escenarios de Financiación	107

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diferentes tipos de levaduras	17
Figura 2. Proceso de evolución celular	21
Figura 3. Diagrama general de entradas y salidas.....	88
Figura 4. Diagrama genérico de bloques GBFD	89
Figura 5. Diagrama de bloques de proceso	90
Figura 6. Flujo Esquemático para una bomba	93

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Absorbancia Vs. Longitud de Onda para verificar cambios con la esterilización del agua	45
Gráfica 2. Demanda Química de Oxígeno Vs. Tiempo para verificar cambios con la esterilización del agua.....	46
Gráfica 3. Resultados Demanda Química de Oxígeno para Blanco de Degradación vs Tratamiento con Inoculación.....	57
Gráfica 4. DQO vs Tiempo para aislamiento 16, 18, 19 y 20 para los pretratamientos E1 y E2. a) Aislamientos en ensayo 1. b) Aislamientos en ensayo 2.	66
Gráfica 6. DQO vs Tiempo. Estudio efecto concentración de glucosa y velocidad de agitación, a) 10 g/L glucosa, b) 3 g/L glucosa, c) 3 g/L glucosa, con las tres velocidades de agitación.	74
Gráfica 7. Concentración proteína celular vs Tiempo para las concentraciones de glucosa y la velocidad de agitación.....	80
Gráfica 8. DQO vs Tiempo para la concentración de Peptona	83
Gráfica 9. Concentración de Proteína Celular vs tiempo para las concentraciones de peptona.....	85
Gráfica 19. Comportamiento de la TIR frente a la Financiación	107
Gráfica 10. Comportamiento del VPN frente a la Financiación.....	108
Gráfica 11. Flujo de Efectivo para el proyecto Seleccionado.....	110

LISTA ANEXOS

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

Anexo II. Caracterización del Agua Residual

Anexo III. Protocolo de Tinción de Gram.

Anexo IV. Protocolo del Método de Lowry.

Anexo V. Resultado Identificación Bioquímica del Microorganismo

Anexo VI. Tabla de Equipos, Tabla de Corrientes y PFD

Anexo VII. Fichas Técnicas Equipos

Anexo VIII. Tablas Análisis Financiero

Anexo IX. Fotografías

LISTA ECUACIONES

Ecuación 1. Cálculo de la Demanda Química de Oxígeno

Ecuación 2. Calculo de concentración del FAS.

Ecuación 3. Calculo de cantidad de agua requerida para preparación de caldos

Ecuación 4. Ecuación general de conservación de masa y energía

Ecuación 5. Balance de Energía para Bombas.

Ecuación 6. Diámetro de un Vessel.

RESUMEN

La idea de este proyecto surgió ante la necesidad que tiene la empresa bajo estudio, de hacerle un tratamiento al agua residual de los procesos que es descargada directamente al alcantarillado, ya que estas deterioran las tuberías y a su vez contaminan las fuentes receptoras, en este caso, las quebradas aledañas a la planta de producción, además ocasionan malos olores que causan malestar y afecciones a la salud colectiva vecina.

El proyecto fue desarrollado a escala laboratorio en el cual se aislaron microorganismos de los efluentes tratados. La investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad EAFIT en la ciudad de Medellín. Inicialmente se obtuvieron 20 aislamientos, y a partir de ensayos realizados de adaptación por presión estos se fueron eliminando hasta tener finalmente 4 microorganismos viables con los cuales se podían empezar los ensayos de remoción de DQO (Demanda Química de Oxígeno).

Se verificó que no había diferencias significativas para la remoción de DQO si se esterilizaba o no el agua residual, por consiguiente se siguió trabajando sin esterilizar, esto con el fin de reducir costos, ya que a escala industrial los costos de los procesos de esterilización son altos.

Se encontró que la reducción de la DQO por parte de los 4 microorganismos seleccionados preliminarmente fue muy similar, esto se corrobora con el análisis estadístico, el cual no tiene diferencias significativas. Sin embargo, se seleccionó el aislamiento que presentó un mayor porcentaje de remoción y crecimiento celular para el proceso.

Con esta última cepa se mejoró el medio de cultivo y la velocidad de agitación para lograr un crecimiento celular adecuado y una mayor reducción de los contaminantes.

Los ensayos se realizaron por duplicado para la etapa del proyecto en medio sólido y se trabajó por triplicado para la etapa de siembra en medio líquido. En estos últimos se encontró que el mejor medio de cultivo es aquel que contiene 3 g/L de glucosa, 1.5 g/L de peptona y velocidad de agitación de 100 rpm en un agitador orbital, lográndose una remoción del 92.8% en la DQO.

Debido a que los ensayos se hicieron a escala laboratorio, fue necesario escalar las condiciones de estos mediante el diseño conceptual de una planta piloto de tratamiento según los requerimientos que presenta la empresa; se elaboraron los diagramas de flujo de proceso, el diseño de los equipos y los balances básicos de masa y energía.

Por último, se realizó un análisis financiero con los diferentes escenarios de financiación planteados; el estudio mostró que la implementación de la planta de tratamientos de aguas residuales es un costo viable en el cual la empresa debe incurrir debido a las legislaciones y su compromiso con el ambiente, financiando el 40% del proyecto.

Palabras claves: biodegradación, DQO, optimización medio de cultivo, adaptación

ABSTRACT

The idea of this project came up from the company requirement of treating the sewage waters used in the chemical processes which go straight to the sewer, damaging the pipes, contaminating the recipients (usually small rivers) and generating stinky smells that causes affections to the health and wellbeing of the community around them.

That project was developed in a laboratory scale where the strains were isolated from the waste disposal sites. The research was performed in the biotechnology laboratory of EAFIT University. Initially, 20 strains were obtained from the isolation, and many of them were eliminated by pressure adjustment experiments. Finally 4 strains were used to begin with the degradation essays.

No significant differences were found in COD (Chemical Oxygen Demand) reduction whether the sewage water was sterilized or not, therefore the experiment continued without any sterilization, with the propose to decrease operation cost at industrial scale.

It was found that the COD reduction between the 4 chosen strains were very similar proved by the statistic analysis, finally, one of them was chosen helped by the cellular growing and the COD reduction percentage.

The culture medium and the agitation speed was improved to achieved and adecuated the cellular growth and pollutants degradation. For isolate chosen in the experiments, were developed by triplicate, were found that the best process conditions were performed at 100 rpm, 3 g/L of glucose and 1.5 g/L of peptone achieving a removal of 92.8 %.

Due to the fact that the essays were carry into laboratory scale, it was necessary to scale up the conditions of treatment using a conceptual design of a pilot plant treatment according to the company requirements; it was fulfilled the elaboration of the process flow diagrams, the equipments design and the basic mass and energy balances.

Finally, it is necessary to know what economic viability presents the alternative of implementing this treatment inside the company, and for this a financial analysis was done for the different funding scenes raised; the study shows that the implementation of the waste water plant treatment is a viable cost that the company must incur due to the legislations and its commitment with the environment, financing 40 % of the project.

Keywords: Biodegradation, COD, Culture medium achievement, adaptation

INTRODUCCIÓN

Actualmente, 1100 millones de personas carecen de acceso a agua potable y 2600 millones de personas no disponen de sistemas de saneamiento adecuado, sistemas con los cuales se reducirían un gran número de enfermedades. A pesar de que las Naciones Unidas asumieron el compromiso de reducir a la mitad esta cifra antes del 2015, todos los datos indican que se está muy lejos de conseguirlo (Morato *et al.*, 2006).

El agua es un requerimiento básico para la vida y la salud. Consumir agua en mal estado es una de las principales fuentes de infección y causa de diversas enfermedades gastrointestinales, como el cólera (Morato *et al.*, 2006).

Por otra parte, la demanda global de agua sigue aumentando sin parar. Ante la grave crisis presentada por la escasez de este recurso a nivel global, se plantea una gestión ecosistémica del agua, siguiendo los principios del desarrollo sostenible. Dentro de estas tecnologías sostenibles para el tratamiento del agua están los procedimientos naturales de depuración que no emplean aditivos químicos y que eliminan las sustancias contaminantes, usando vegetación acuática, el suelo y microorganismos (Morato *et al.*, 2006).

Considerar a la industria textil para desarrollar este proyecto es importante debido a que en Colombia esta se ha extendido por todo el territorio nacional, se ha vuelto común en las actividades productivas de la nación y se estima que es uno de los cuatro rubros más representativos y que más utiliza agua en América Latina (Cepis, 1992). Además, se ha encontrado que los procesos textiles utilizan una gran cantidad de compuestos químicos, en su mayoría

líquidos, los cuales son arrojados a las fuentes de agua en los vertimientos de las plantas y pueden causar problemas con compuestos recalcitrantes o xenobióticos que ambientalmente son inaceptables (Cepis, 1992).

Las aguas residuales que se producen en la industria textil, se caracterizan principalmente por:

- Gran variabilidad de caudal y carga contaminante.
- La mayor parte de su contaminación está bajo la forma soluble.
- Generalmente presentan fuerte coloración.
- Los efluentes producidos en las operaciones de tintura y acabado presentan materia orgánica expresada como Demanda Química de Oxígeno (DQO) que en general triplica o cuadruplica la DBO. Esto indica la pobre biodegradabilidad de este tipo de descargas (Cepis, 1992).

La descarga de dichos efluentes textiles en el alcantarillado puede crear problemas al sistema de recolección. Los efluentes con alto contenido de sulfuro o sulfatos pueden provocar grietas o roturas en el concreto de las estructuras si las concentraciones son mayores de 300 mg/L para el cemento concreto Portland. El gas sulfhídrico generado en la tubería, a concentraciones mayores o iguales a 1 mg/L, puede ser oxidado a ácido sulfúrico sobre las paredes, atacar el concreto y corroer las partes metálicas (Gardiner y Borne 1978).

Los efluentes textiles deben controlarse y debe estudiarse la calidad de estos para aplicar tratamientos biológicos, ya que existe una amplia gama de elementos químicos que pueden afectar la eficiencia de operación de las plantas de tratamiento biológico, inclusive si están presentes en bajas concentraciones (presencia de fenoles, determinados colorantes, metales pesados y detergentes) (Cepis, 1992).

Es común encontrar que el tratamiento biológico se realice como tratamiento secundario de las aguas residuales. Los microorganismos utilizados durante el proceso de tratamiento, normalmente, serán capaces de reducir en forma significativa el contenido en contaminantes, utilizándolos como fuente de energía y nutrientes, o receptores de electrones durante la respiración.

Existen varios métodos para determinar la concentración de contaminantes, y son de uso habitual en los sectores industriales. Los más comunes son la demanda biológica de oxígeno (DBO), y la Demanda Química de Oxígeno (DQO) (Levin y Gealt, 1997).

Las tecnologías que emplean microorganismos para la destrucción de compuestos orgánicos, han sido, históricamente, los tratamientos más utilizadas por su bajo costo frente a los métodos físicos y químicos. Estas tecnologías son menos costosas porque las reacciones de degradación, medidas por la actividad biocatalítica natural, se producen a velocidades rápidas a temperatura ambiente. Por lo tanto, los costos energéticos del tratamiento son relativamente bajos (Levin y Gealt, 1997).

Con la realización de este proyecto se desarrolló un plan de recuperación de las aguas residuales de una empresa de tintorería, y se escogió la biodegradación del agua como técnica a utilizada para la disminución de este impacto. Esta técnica se basó en el uso de un microorganismo que utilizan como sustrato algunas de las sustancias contaminantes de origen orgánico y, por ende, son degradadas para ser utilizadas en su metabolismo.

1. OBJETIVOS

1.1 GENERAL

Evaluar la biodegradación de las aguas residuales de una lavandería y tintorería mediante el uso de microorganismos con el fin de disminuir el nivel de la Demanda Química de Oxígeno y la coloración de los vertimientos de la empresa estudiada.

1.2 ESPECÍFICOS

- Determinar un medio de cultivo para realizar la selección de un microorganismo viable presente en las aguas residuales de la empresa, con el cual se pueda trabajar y utilizar en el proceso de biodegradación.
- Realizar la identificación preliminar del microorganismo aislado mediante pruebas bioquímicas.
- Evaluar la cinética de crecimiento del microorganismo aislado de las aguas del vertimiento de la empresa para comprender el comportamiento, por medio de diferentes ensayos de laboratorio programados a partir de un diseño de experimentos.
- Evaluar la biodegradación de las aguas de vertimiento de la empresa por medio del microorganismo aislado con el fin de determinar la disminución de la Demanda Química de Oxígeno.

- Efectuar el diseño básico del proceso de biodegradación del agua residual a escala laboratorio de la empresa estudiada, mediante los respectivos procedimientos y diagramas de aplicación.
- Determinar la prefactibilidad económica de la implementación del tratamiento en estudio en la empresa en cuestión, mediante análisis de costos y financieros.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 CARACTERÍSTICAS DE LAS AGUAS RESIDUALES

El conocimiento de la naturaleza del agua residual es esencial para el proyecto de las instalaciones de recogida, tratamiento y evacuación, y para la gestión de calidad del medio ambiente cuando un agua residual va a ser tratada (Metcalf-eddy, 1994).

Las propiedades físicas y los constituyentes químicos y biológicos de las aguas residuales se encuentran, junto con sus procedencias en la Tabla 1:

Tabla 1. Características Físicas, Químicas y Biológicas del agua residual y su procedencia (Metcalf-eddy, 1994)

CARACTERÍSTICAS	PROCEDENCIA
Propiedades físicas	
Color	Aguas residuales domésticas e industriales, desintegración natural de materiales orgánicos.
Olor	Agua residual en descomposición, vertidos industriales
Sólidos	Agua de suministro, aguas residuales domésticas e industriales, erosión del suelo, infiltración y conexiones incontroladas.
Temperatura	Aguas residuales domésticas e industriales.
Constituyentes químicos	
Carbohidratos	Aguas residuales comerciales e industriales.
Metales pesados	Vertidos industriales.
Cloruros	Agua de suministro, aguas residuales domésticas, infiltración del agua subterránea, ablandadores de agua.
Alcalinidad	Aguas residuales domésticas
pH	Vertidos industriales
Azufre	Aguas de suministro, aguas residuales domésticas e industriales.
Constituyentes biológicos	
Plantas	Curso de agua y plantas de tratamiento
Protistas	Aguas residuales domésticas, plantas de tratamiento

2.1.1 Características físicas

2.1.1.1 Sólidos totales: Analíticamente, el contenido de sólidos totales de un agua residual se define como toda la materia que queda como residuo de evaporación a 103-105°C. Estos pueden clasificarse como sólidos suspendidos o sólidos filtrables. La fracción de sólidos suspendidos incluye los sólidos sedimentables que se depositarán en el fondo de un recipiente en forma de cono durante un periodo de 60 minutos. La fracción de sólidos filtrables se compone de sólidos coloidales y disueltos. La fracción coloidal consiste en partículas con un diámetro aproximado que oscila entre 10^{-3} y $1 \mu\text{m}$, y no puede eliminarse por sedimentación. Los sólidos disueltos se componen de moléculas orgánicas e inorgánicas e iones que se encuentran presentes en una disolución verdadera en el agua. (Metcalf-eddy, 1994)

A su vez, cada una de estas clases de sólidos puede clasificarse de nuevo con base en su volatilidad a 600° C. La fracción orgánica se oxidará y será expulsada como gas a dicha temperatura, permaneciendo la fracción inorgánica como ceniza. Por tanto, los términos *sólidos suspendidos volátiles* y *sólidos suspendidos fijos* se refieren, respectivamente al contenido orgánico e inorgánico (mineral) de los sólidos suspendidos (Metcalf-eddy, 1994).

2.1.1.2 Olores: Normalmente los olores son debidos a los gases producidos por la descomposición de la materia orgánica. El agua residual reciente tiene un olor peculiar algo desagradable, pero más tolerable que el del agua residual séptica. Las aguas residuales industriales contienen a veces compuestos olorosos o capaces de producir olores en el proceso de tratamiento (Metcalf-eddy, 1994).

2.1.1.3 Temperatura: La temperatura del agua residual es generalmente más alta que la del agua de suministro, debido a la adición de agua caliente

procedente de las casas y actividades industriales. La temperatura del agua es un parámetro muy importante por su efecto en la vida acuática, en las reacciones químicas y velocidades de reacción, y en la aplicabilidad del agua a usos útiles. Por otro lado, el oxígeno es menos soluble en agua caliente que en la fría. El aumento de la velocidad de las reacciones químicas que supone un aumento en la temperatura, junto con la disminución del oxígeno presente en las aguas superficiales, puede frecuentemente causar graves agotamientos de las concentraciones de oxígeno disuelto (Metcalf-eddy, 1994).

2.1.1.4 Color: En forma cualitativa el color puede ser usado para estimar la condición general del agua residual. 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).

2.1.2 Características químicas orgánicas

En un agua residual de concentración media, un 75% de los sólidos suspendidos y un 40% de los sólidos filtrables son de naturaleza orgánica. Proceden de los reinos animal y vegetal y de las actividades humanas relacionadas con la síntesis de compuestos orgánicos. Los compuestos orgánicos están formados generalmente por una combinación de carbono, hidrógeno y oxígeno, junto con nitrógeno en algunos casos. Otros elementos importantes tales como azufre, fósforo y hierro pueden hallarse también presentes. Los principales grupos de sustancias orgánicas hallados en el agua residual son las proteínas (40 a 60%), carbohidratos (25 a 50%) y grasas y aceites (10%) (Metcalf-eddy, 1994).

2.1.2.1 Medida del contenido orgánico: Los métodos de laboratorio más utilizados hoy día, entre otros, son el de la demanda bioquímica de oxígeno (DBO), Demanda Química de Oxígeno (DQO) y carbono orgánico total (COT) (Metcalf-eddy, 1994).

2.1.2.2 Demanda Química de Oxígeno: El ensayo de la DQO se emplea para medir el contenido de materia orgánica tanto de las aguas naturales como de las residuales. El equivalente de oxígeno de la materia orgánica que puede oxidarse se mide utilizando un agente químico fuerte oxidante en medio ácido. El dicromato potásico resulta excelente para tal fin. El ensayo debe realizarse a temperatura elevada. Para facilitar la oxidación de ciertas clases de compuestos orgánicos se necesita un catalizador (sulfato de plata) (Metcalf-eddy, 1994).

2.1.3 Características químicas inorgánicas

Son varios los componentes inorgánicos de las aguas residuales y naturales que tienen importancia para el establecimiento y control de la calidad del agua. Las concentraciones de las sustancias inorgánicas en el agua aumentan por la formación geológica con la que el agua entra en contacto y también por las aguas residuales, tratadas o sin tratar, que se descargan a ella (Metcalf-eddy, 1994).

2.1.3.1 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 (Lenntech, 2000).

2.1.3.2 Cloruros: Los cloruros que se encuentran en el agua natural proceden de la disolución de suelos y rocas que los contienen y que están en contacto con el agua, y, en las regiones costeras, de la intrusión del agua salada (Metcalf-eddy, 1994).

2.1.3.3 Metales pesados: Trazas de muchos metales, tales como el níquel (Ni), manganeso (Mn), plomo (Pb), cromo (Cr), cadmio (Cd), cinc (Zn), cobre (Cu), hierro (Fe) y mercurio (Hg) son importantes constituyentes de muchas aguas. Algunos de estos metales son necesarios para el desarrollo de la vida biológica y su ausencia en cantidades suficientes podría, por ejemplo, limitar el crecimiento de las algas. La presencia de cualquiera de los metales citados en cantidades excesivas interferirá con muchos usos provechosos del agua dada su toxicidad; por tanto, conviene casi siempre medir y controlar las concentraciones de dichos metales (Metcalf-eddy, 1994).

2.1.4 Características biológicas

2.1.4.1 Microorganismos: Los grupos principales de organismos que se encuentran en las aguas superficiales y residuales se clasifican en protistas, vegetales y animales. La categoría de los protistas incluyen las bacterias, hongos, protozoos y algas (Metcalf-eddy, 1994).

2.2 NORMATIVIDAD

Colombia cuenta con las normas de vertimiento redactadas desde el Ministerio de Salud en su decreto No. 1594 del 26 de Junio de 1984 (Anexo I), en el cual en sus artículos 72 y 73 respectivamente dice: (Minambiente, 2006)

2.2.1 Artículo 72

Todo vertimiento a un cuerpo de agua deberá cumplir, por lo menos, con las normas que se presentan en la Tabla 2:

Tabla 2. Parámetros de la norma para el artículo 72 (Decreto 1594,1984) (Minambiente, 2006).

REFERENCIA	USUARIO NUEVO
pH	5 a 9 unidades
Temperatura	<40° C.
Grasas y aceites	Remoción >80% en carga
Sólidos suspendidos, domésticos o industriales	Remoción >80% en carga
DQO para desechos industriales	Remoción >80% en carga
DBO ₅ para desechos industriales	Remoción >80% en carga

2.2.2 Artículo 73

Todo vertimiento a un alcantarillado público deberá cumplir, por lo menos, con las normas, presentes en la Tabla 3:

Tabla 3. Parámetros de la norma para el artículo 73 (Decreto 1594,1984) (Minambiente, 2006).

REFERENCIA	VALOR
pH	5 a 9 unidades
Temperatura	<40° C
Sólidos sedimentables	< 10 mL / 1
Sustancias solubles en hexano	< 100 mg / 1
Caudal máximo	1.5 veces el caudal promedio horario
DQO para desechos industriales	Remoción >80% en carga.
DBO ₅ para desechos industriales	Remoción >80% en carga

2.3 BIODEGRADACIÓN

La biodegradación puede definirse como el uso de organismos vivos, componentes celulares o enzimas libres en la mineralización, transformación

parcial o humidificación de residuos o agentes contaminantes. El tratamiento de biodegradación aplicado en aguas varía de acuerdo con las propiedades físico-químicas del contaminante y el tipo de agua (Morato *et al.*, 2006).

En la Tabla 4 se presentan algunos procesos biológicos de gran utilidad que son utilizados actualmente en los tratamientos de las aguas residuales.

Tabla 4. Algunos procesos biológicos utilizados en el tratamiento del agua residual (Metcalf-eddy, 1994).

TIPO	NOMBRE COMÚN	USO
Procesos aeróbicos:		
Cultivo en suspensión	Proceso de fangos activados	Eliminación de la DBO carbonasa (nitrificación)
Cultivo fijo	Filtros percoladores	Eliminación de la DBO carbonasa (nitrificación)
Procesos anóxicos		
Cultivo en suspensión	Desnitrificación con cultivo en suspensión	Desnitrificación
Procesos anaerobios		
Cultivo en suspensión	Digestión anaerobia	Estabilización, eliminación de la DBO carbonasa

La biodegradación *in situ* se establece en el lugar donde ocurrió la contaminación y la *ex situ* se lleva a cabo retirando el agua contaminada y trasladándola hasta una unidad de tratamiento (Morato *et al.*, 2006).

En la biodegradación *in situ* existen dos estrategias: la primera es agregar nutrientes para estimular las poblaciones naturales y así aumentar su actividad para que degraden el contaminante. La segunda es introducir microorganismos exógenos para que ellos realicen la degradación. En este último caso se pueden emplear microorganismos genéticamente modificados para hacerlos más eficientes. Ambas estrategias se basan en la asimilación de las sustancias orgánicas por los microorganismos, los cuales las utilizan

como fuente de carbono y energía necesaria para sus funciones y crecimiento (Morato *et al.*, 2006).

2.3.1 Ventajas y desventajas de la biodegradación

2.3.1.1 Ventajas:

- Generalmente solo se originan cambios físicos menores sobre el medio.
- Cuando se usa correctamente no produce cambios adversos significativos.
- Ofrece una solución más simple y completa que las tecnologías mecánicas.
- Menos costosa que otras tecnologías físico-químicas.

2.3.1.2 Desventajas:

- Para muchos tipos de contaminantes su efectividad no ha sido determinada.
- El tiempo necesario para actuación es largo.
- Su implementación es específica para cada lugar contaminado.
- Su optimización requiere información sustancial acerca del lugar contaminado y las características del contaminante (Morato *et al.*, 2006).

2.3.2 Diseño de los medios de cultivo

A la hora de diseñar un medio de cultivo no sólo hay que tener en cuenta los nutrientes sino también las condiciones físicas que permitan el crecimiento de los microorganismos (Mateos, 2007).

2.3.2.1 Aporte de nutrientes: La cantidad y naturaleza de los nutrientes en un medio de cultivo viene determinada por el rendimiento de un producto en especial, además de los requerimientos nutricionales del microorganismo (Mateos, 2007).

2.3.2.2 pH: Cada organismo tiene un rango de pH dentro del cual es posible el crecimiento y normalmente posee un pH óptimo muy bien definido. La mayoría de los ambientes naturales tienen valores de pH de 5, 9 y los organismos con pH óptimos equivalentes son los habituales. Solo unas pocas especies pueden crecer a pH inferior a 2 o mayor a 10 (Madigan, 1999).

2.3.2.3 Control de la temperatura: El desarrollo de las bacterias depende de reacciones químicas y la velocidad con que se efectúan estas reacciones está influida por la temperatura, por lo que esta puede, en parte, determinar la velocidad de crecimiento de los microorganismos. Cada especie microbiana posee una temperatura óptima de crecimiento clasificándose según esto en los siguientes grupos (Mateos, 2007):

- **Psicrófilas:** capaces de desarrollarse a 0° C o menos. Su temperatura óptima es alrededor de los 15° C.
- **Mesófilas:** crecen mejor entre 25 y 40° C.
- **Termófilas:** crecen mejor entre 45 y 60° C.

2.3.3 Papel de los microorganismos

En la eliminación de la DBO carbonosa, la coagulación de sólidos coloidales sedimentables y la estabilización de la materia orgánica se consigue

biológicamente utilizando una variedad de microorganismos principalmente bacterias (Metcalf-eddy, 1994).

Los microorganismos se usan para convertir la materia orgánica carbonosa coloidal y disuelta en diversos gases en tejido célula. Dado que el tejido celular tiene un peso específico ligeramente mayor que el del agua, el tejido resultante puede eliminarse del líquido tratado por decantación (Metcalf-eddy, 1994).

Dentro de los microorganismos más importantes en los procesos de tratamiento biológico están: 1) bacterias, 2) hongos, 3) algas, 4) protozoos, 5) rotíferos 6) crustáceos 7) virus (Metcalf-eddy, 1994). Debido a que este estudio se realizó con una levadura, se centrará la teoría al estudio de ellas.

2.3.3.1 Hongos: Los hongos son protistas heterótrofos, no fotosintéticos y multicelulares. Los hongos se clasifican generalmente por su modo de reproducción. Se reproducen sexual o asexualmente, por escisión, gemación o formación de esporas. Los mohos u hongos verdaderos producen unidades microscópicas (hifas), que colectivamente forman una masa filamentosa llamada micelio. Las levaduras son hongos que no pueden formar un micelio y, por tanto, son unicelulares. (Metcalf-eddy, 1994)

2.3.3.2 Levaduras: La mayoría de las levaduras son mesófilas, con una temperatura máxima de crecimiento entre 24 y 48° C. En general, la presencia de etanol o bicarbonato aumenta la temperatura mínima de crecimiento (Déak y Beuchat, 1996).

La mayoría de las levaduras toleran un rango de pH entre 3 y 10, pero prefieren un medio ligeramente ácido con un pH de 4,5 a 6,5. Sin embargo, las levaduras basidiomicéticas *Rhodotorula* y *Cryptococcus* son especialmente tolerantes a los medios alcalinos, mientras que *Saccharomyces*,

Schizosaccharomyces y *Dekkera* no crecen a pH mayor que 8. Por otra parte, las células son inactivadas a presiones entre 7 y 20 MPa, a 25-35° C (Déak y Beuchat, 1996).

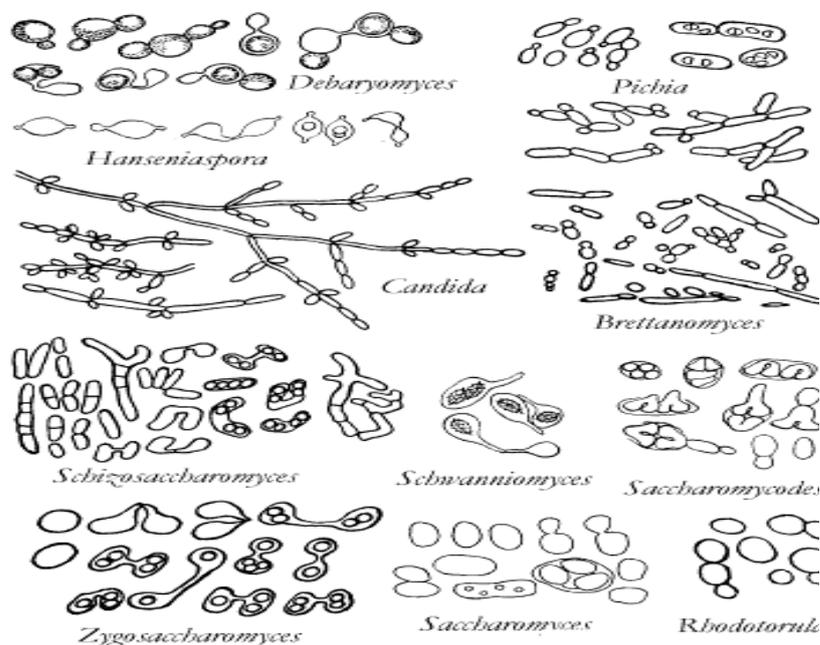
Las levaduras son organismos aerobios y aunque unas especies son fermentadoras otras no lo son como por ejemplo los géneros *Cryptococcus* y *Rhodotorula*. *Saccharomyces* y unos pocos géneros más, son fermentadores enérgicos de los azúcares pero pronto detienen su crecimiento y multiplicación por falta de oxígeno. *Dekkera* y su anamorfo *Brettanomyces*, *Zygosaccharomyces bailii* y algunas otras, fermentan glucosa más rápidamente bajo condiciones aerobias que anaerobias. Solo unos pocos glucósidos, principalmente hexosas y oligosacáridos, pueden ser fermentados por las levaduras, pero el rango de compuestos que pueden asimilar es mucho más amplio incluyendo además, pentosas, alcoholes, ácidos orgánicos, aminoácidos y glicósidos (Déak y Beuchat, 1996).

La utilización de nitratos está confinada a ciertas especies de levaduras, mientras que las fuentes comunes de nitrógeno son amonio, urea y aminoácidos. Muchas especies sintetizan todas las vitaminas necesarias pero otras requieren biotina y otros compuestos. *Dekkera* necesita altas concentraciones de tiamina y *Schizosaccharomyces octosporus* de adenina, para un buen crecimiento (Carrillo, 2007).

La formación de hifas, blastoconidias, clamidosporas o artrosporas por parte de las levaduras constituye una característica morfológica de gran importancia para la identificación de algunas especies de levadura. Ante la presencia de estructuras con aspecto de hifas, lo primero que hay que determinar es si se trata de pseudohifas (resultantes del proceso de formación de blastoconidias y, por tanto, con puntos regulares de estrechamiento) o, por el contrario, son verdaderas hifas que se fragmentan en artroconidias.

Si el desarrollo en medios especiales revela la presencia de pseudohifas y blastoconidias, la levadura a identificar pertenece a alguna especie del género *Candida*. Si por el contrario, revela verdaderas hifas y arthroconidias, lo más probable es que se trate de especies de *Trichosporon*, *Geotrichum* o *Blastoschizomyces* (Carrillo, 2007).

Figura 1. Diferentes tipos de levaduras (Carrillo, 2007).



2.3.3.2.1 *Rodhotorula mucilaginosa*: El género *Rodhotorula* es muy abundante en un gran número de fuentes naturales y superficies húmedas. Se caracteriza por producir colonias de color rojo coral, debido a la presencia de un pigmento carotenoide y por su incapacidad para formar hifas o pseudohifas. Produce ureasa y carece de actividad fermentativa. Es también conocida como *Rodhotorula rubra* (García et al., 2002).

La diferenciación de las distintas especies del género *Rodhotorula* se basa principalmente en la asimilación y reducción de nitratos (positiva para *R. glutinis* y negativa para *R. mucilaginosa* y *minuta*). Crecimiento a 37 °C

(positivo para mucilaginosa y variable para glutinis y minuta) (García *et al.*, 2002).

La *Rodhotorula* se asemeja a *Cryptococcus* en su velocidad de crecimiento, la morfología de las colonias, el tamaño y la forma de las células, la posible presencia de cápsula, la producción de ureasa y la carencia de actividad fermentativa, pero se diferencia por la capacidad de asimilar el inositol (García *et al.*, 2002).

2.3.4 Adaptación microbiana

La adaptación 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 microbianas que quieran ser introducidas para degradar los efluentes (Benavides, 1999).

2.3.5 Cinética microbiana

A diferencia de la catálisis por enzimas, las reacciones llevadas a cabo directamente por células, presentan una mayor complejidad a la hora de encontrar un modelo cinético que describa su comportamiento. Tal hecho estriba en que ahora los sustratos y nutrientes tienen que pasar desde el medio fluido a la superficie de las células y atravesar las membranas celulares e incorporarse a la masa celular donde a medida que se difunden

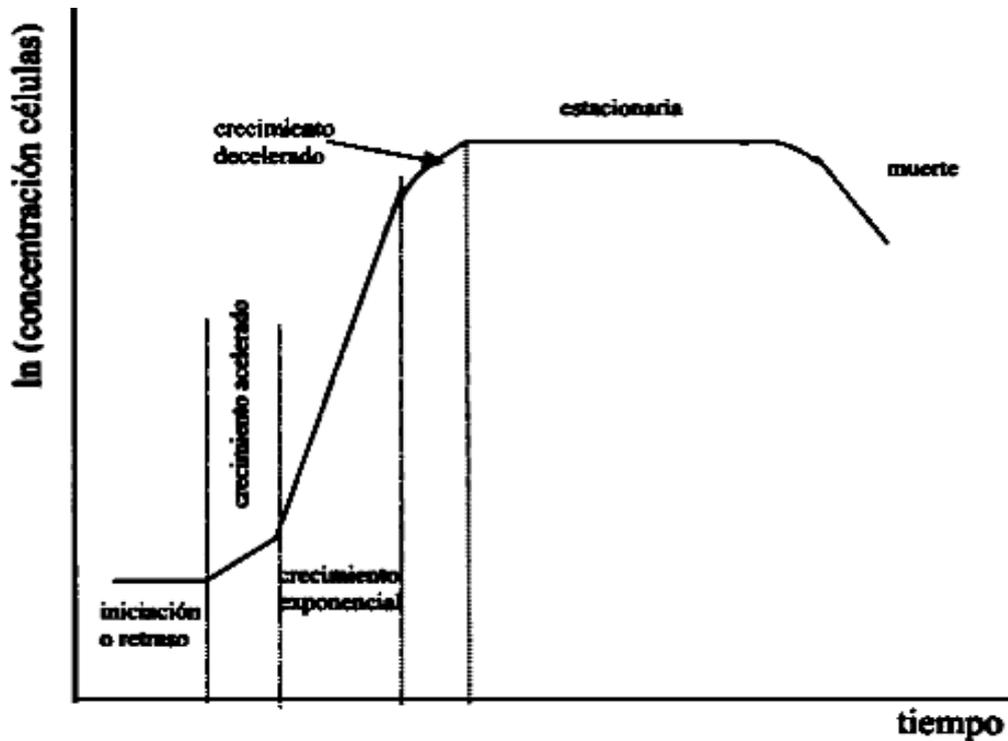
puede ir ya reaccionando en presencia de las enzimas intracelulares. A su vez, los productos formados tienen que seguir el camino inverso hacia la masa global del fluido. Intentar modelar un proceso tan complejo resulta muy difícil y en el caso de plantearlo se precisaría de la determinación de numerosos parámetros, algunos de ellos imposibles de estimar (Izquierdo *et al.*, 2004).

De este modo, será necesario realizar una serie de hipótesis simplificadoras con el fin de disponer de modelos (modelo no estructurado y no segregado) suficientemente simples para poder utilizarlos en el diseño de biorreactores. Entre las hipótesis relativas al conjunto de microorganismos que constituyen una población se admite la no estructuración de las células en funciones diferentes, de tal modo que una variable pueda caracterizar su comportamiento (masa celular, número de célula, entre otros), y la uniformidad en la distribución de las células en el volumen considerado. Por otro lado, algunas de las variables que pueden influir en el comportamiento de los microorganismos, como son la temperatura, la presión, el pH, la presencia de luz, suelen ser constantes o presentar variaciones mínimas poco significativas en un proceso determinado. Así, más concretamente, se suele admitir que sólo un reducido número de factores puede influir en el proceso y se les denomina *factores limitantes*, y, entre estos, destaca en numerosos procesos microbianos el sustrato (Izquierdo *et al.*, 2004).

Cuando una pequeña cantidad de células vivas (inóculo) se añade a una solución de nutrientes (N, S, P, Na, K, Ca, etc.) y sustrato (fuente de carbono y energía) en unas condiciones óptimas de temperatura y pH, se produce un proceso de crecimiento celular (Izquierdo *et al.*, 2004). El proceso de evolución celular se muestra en la Figura 2 y puede desglosarse en las siguientes etapas (Metcalf-eddy, 1994):

- 1) Fase de retardo: Tras la adición de un inóculo a un medio de cultivo, la fase de retardo representa el tiempo requerido para que los microorganismos se aclimaten a sus nuevas condiciones ambientales.
- 2) Fase de crecimiento logarítmico: Durante este periodo, la célula se divide a una velocidad determinada por su tiempo de generación y su capacidad de procesar alimento (velocidad constante de crecimiento porcentual).
- 3) Fase estacionaria: En este caso la población permanece estacionaria. Las razones que se apuntan para este fenómeno son: a) que las células han agotado el sustrato o los nutrientes necesarios para el crecimiento, y b) que el crecimiento de nuevas células se nivela por la muerte de células viejas.
- 4) Fase de muerte logarítmica: Durante esta fase la velocidad de muerte de células excede la producción de células nuevas. La velocidad de muerte generalmente es función de la población viable y de las características ambientales.

Figura 2. Proceso de evolución celular (Izquierdo *et al.*, 2004)



2.3.6 Pruebas bioquímicas para la identificación de microorganismos

2.3.6.1 Tinción de gram: Es la tinción diferencial más utilizada en microbiología y lleva su nombre en honor al microbiólogo que la describió. Dependiendo del resultado de esta tinción, las bacterias pueden dividirse en dos grandes grupos: **Gram positivas** y **Gram negativas**. Una vez terminada la tinción de Gram, las bacterias Gram positivas aparecen de color púrpura y las Gram negativas presentan un color rojo. La distinta tinción de estos dos grupos de bacterias se basa en las diferencias que presentan sus paredes celulares (Madigan *et al.*, 1999).

La pared celular de las Gram negativas está compuesta por varias capas y es bastante compleja, mientras que la pared de las Gram positivas está formada fundamentalmente por un tipo de moléculas y es mucho más ancha; en bacterias Gram positivas el peptidoglicano representa hasta el 90% de la pared y en bacterias Gram negativas el peptidoglicano constituye alrededor del 10% (Madigan *et al.*, 1999).

2.3.6.2 Prueba de la oxidasa: El test de la oxidasa indica la presencia de la enzima *cytrocromo oxidasa*. El principio del método es que la enzima *cytrocromo oxidasa* está en capacidad de oxidar el sustrato terametil-p-fenilendiamina dihidroclorhidrico, formando un producto final coloreado, indofenol. El púrpura oscuro del producto final será visible si una pequeña cantidad de una cepa de crecimiento que produzca la enzima es frotada sobre un sustrato impregnado en el papel filtro (Csuros y Csuros, 1999).

En caso positivo el papel cambia de color pasando a púrpura y negro en 10-20 segundos, como consecuencia de que el reactivo se oxida en presencia de citocromo c oxidasa formándose azul de Wuster. En caso negativo la tira de papel no cambia de color (Koneman *et al.*, 1997).

2.3.6.3 Prueba de la catalasa: La catalasa es una enzima que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. Se encuentra presente en la mayoría de los microorganismos aeróbicos y anaeróbicos facultativos, excluyendo los *estreptococos*. La prueba se considera positiva cuando se produce una efervescencia rápida con desprendimiento de burbujas: la enzima catalasa convierte el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular (Koneman *et al.*, 1997).

2.3.6.4 Agar King A y King B: Es una prueba útil para poner de manifiesto la formación de compuestos pigmentados por microorganismos no fermentadores (Koneman *et al.*, 1997).

La presencia de *Pseudomonas aeruginosa* sobre la placa de agar King B se manifiesta por la aparición de un pigmento amarillo fluorescente (fluoresceína o pioverdina) y un pigmento azul (piocianina) sobre la placa de agar King A. La composición de sales de cada uno de estos dos medios potencia la producción de uno de los pigmentos e inhibe la del otro (Koneman *et al.*, 1997).

2.3.6.5 Agar Cetrimide: Es un agar específico para el crecimiento de *Pseudomonas*, ya que tiene componentes que favorecen su aislamiento y es un medio común para la recuperación del género (Jaramillo *et al.*, 2006).

2.4 DISEÑO CONCEPTUAL

El producto del diseño conceptual, como su nombre lo indica, es un concepto, el cual se refiere a la combinación de principios físicos, químicos y biológicos que satisfacen la función o propósito, las características, atributos, restricciones, deseos después de analizar y escoger la mejor entre las mejores alternativas (Escobar, 2005).

En una forma más concreta, se establece que el diseño conceptual para el Ingeniero de Procesos, se ocupa entonces de producir todos y cada uno de los siguientes resultados (Escobar, 2005):

- El que proviene de un proceso de abstracción, en el cual se establece claramente *la función o propósito* que se debe aplicar a las entradas

(materia, energía, información) para convertirlas en productos (materia, energía, información). Esto es asimilable al Diagrama General de Entradas y Salidas (Overall Diagram), Diagrama de Bloques de Proceso (BFD), Diagrama Genérico de Bloques.

Cabe anotar que la inclusión de los conceptos de secuencia, la confiabilidad y las consideraciones generales de seguridad, deben estar presentes en esta etapa.

- Matriz morfológica (funciones, *operaciones unitarias* vs. portadores de función, *alternativas*)
- Estimación de los costos (capital y manufactura), del tipo *orden de magnitud /estudio*.
- Definición de una *función objetivo* que permita sustentar la escogencia de la mejor alternativa.
- Producción de una estructura funcional, asimilable al Process Flow Diagram, PFD, que incluye (Turton *et al.*, 2003):
 - a. Flowsheet, o secuencia de las operaciones (Incluye los lazos básicos de Control)
 - b. Tabla Resumen de los Equipos (Código de los equipos, Variables dependientes del Diseño)
 - c. Tabla de Corrientes (Exige el balance de masa y energía)
 - d. Descripción del Proceso.

2.5 ANTECEDENTES RELACIONADOS CON TRATAMIENTOS BIOLÓGICOS USANDO MICROORGANISMOS

- La remoción del color con microorganismos es una técnica biotecnológica para la decoloración 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 decoloración y biodegradación de estas sustancias en las aguas residuales. Bajo condiciones aerobias los colorantes azo no son totalmente metabolizados, pero bajo condiciones anaerobias muchas bacterias reducen la alta electrofilicidad azo en las moléculas del tinte y logran la decoloración. En este proceso se pueden utilizar cultivos de bacterias mezcladas que tiene carácter colectivo pero son difíciles de observar en cuanto al proceso, o cultivos de bacterias únicas las cuales son específicas y son fáciles de controlar en el proceso de medición de variables. En los reportes literarios (Pearce *et al.*, 2003) se ha trabajado principalmente con células de ***Bacillus cereus***, ***Sphaerotilus natans*** y ***Arthrobacter s.p.*** para degradar colorantes azo, ***Alcaligenes faecalis*** y ***Commomonas acidovorans*** para degradar colorantes reactivos, diazo, dispersiones de tintes y cianinas; en este caso se reporta una eficiencia de decoloración del 100% bajo condiciones anaeróbicas. Los microorganismos ***Alcaligenes faecalis***, ***Commomonas acidovorans*** también se han utilizado para degradar Remazol Negro B con un porcentaje de decolorización entre 67-89% bajo condiciones anaeróbicas, 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 con una eficiencia promedio de 50% y una larga lista de microorganismos que permiten la descomposición de los colorantes. La biomasa en este tipo de cultivos es la que se encarga de adsorber los tintes, sin embargo, se presenta un problema por la saturación de la biomasa al retener los colorantes, así pues, este tratamiento no debe ser utilizado para largos tiempos de exposición a los agentes colorantes (Pearce *et al.*, 2003).

- El hongo *Phanerochateae chrysosporium* degradador de ligninas se ha utilizado para degradar colorantes Azo. Se logró biodegradar los colorantes ácido meta-aminosulfónico (y su derivado, el guaiacol) y el ácido meta-aminobenzóico (y su derivado, el syringol) en un 80%. El análisis instrumental realizado confirma la existencia de unas sustancias diferentes a las estudiadas en un principio y esto corrobora la biodegradación de los tintes utilizados. El uso de los colorantes como fuente de carbono fue la causa en el aumento en la biomasa de *P. chrysosporium*. Este hongo presenta la decoloración de las muestras sintéticas de efluentes debido a la amplia gama de fuentes de carbono que puede utilizar y a su sistema enzimático no específico (Adosinda *et al.*, 2002).
- Sandhya *et al.*, (2005) trataron los efluentes que contenían **azul-ácido 15** como colorante con bacterias. En este trabajo se realizó un procedimiento basado en la biodegradación de la sustancia en un reactor de células inmovilizadas. Se logró la decoloración de este trifenilmetano en un 94% utilizando una rata de flujo de 4 mL/h y microorganismos como *Bacillus s.p.*, *Alcaligenes s.p.*, y *aeromonas*. Se evidenció la degradación de la sustancia estudiada por medio de los análisis químicos realizados por espectroscopia N.M.R y cromatografía. La decoloración del colorante se logró por medio de la demetilación. Se reportan en la literatura otros microorganismos como *Pseudomonas i.e*, *Pseudomonas alcaligenes*, *P. mendocina* y *P. stutzen* en tratamientos similares.
- Hay otra forma de tratamiento de los colorantes en los efluentes de las industrias textiles reportado en la literatura para el proceso de trabajo con reactores tipo batch de secuencia aeróbica y microorganismos. Estos autores utilizaron efluentes simulados en los que se obtuvieron resultados de decoloración entre un 90-99% y una reducción del DQO,

esto al trabajar con *Hydrogenophaga palleroni* y con colorantes tipo azo como el Amarillo-3. El estudio se basó en el hecho de que a condiciones microaerofílicas los colorantes azo son decolorizados y la biodegradación ocurre bajo condiciones aireadas. Todo el proceso de purificación de la muestra simulada utiliza la separación de los enlaces azo seguida por una mineralización (Sarnaik y Kanekar, 1999).

- Otro tratamiento reportado en la literatura consistió en la reducción de la DQO de un efluente textil en un 70% evidenciando la reducción de la carga contaminante del efluente, además de lograr la remoción de colorantes como Amarillo básico 28, Amarillo básico 21, Rojo básico 18.1 y otros colorantes básicos violeta y azul en un 90% usando consorcios microbianos (Talarposhti *et al.*, 2000).

3. METODOLOGÍA

3.1 MATERIALES Y EQUIPOS

El siguiente listado corresponde al registro de reactivos, materiales y equipos utilizados para el desarrollo de la investigación.

3.1.1 Reactivos

- Agua del efluente secundario proveniente de la empresa bajo estudio.
- Agar Nutritivo, Agar Sabouraud y Agar Ogy (Merck).
- Peptona Universal y Glucosa (Merck).
- Caldo nutritivo (Merck).
- Agua destilada.
- Agar P y F para *Pseudomonas* y agar cetrimide.
- Ácido sulfúrico (Sigma).
- Sulfato de Plata (Carlo Herba).
- Dicromato de Potasio (Merck).
- Sulfato de mercurio.
- 1,10 Fenantrolina (Merck).
- Sulfato ferroso (Merck).
- Lugol.
- Safranina.
- Cristal violeta (Merck).
- Alcohol-cetona.
- Reactivos para prueba de Catalasa y Oxidasa.
- NaOH.

- NaCl.
- Stock de BSA 400 ppm para Lowry.
- Solución acomplejante para Lowry.

3.1.2 Materiales y Equipos

- Cajas Petri.
- Asas bacteriológicas.
- Micropipetas de 100 μ L, 1000 μ L y 10 mL.
- Eppendorf.
- Tubos de ensayo.
- Vidrio reloj.
- Espátula.
- Tubos de centrifuga de 20 mL.
- Centrifuga universal marca Hettich.
- Erlenmeyer de 250 y 500 mL.
- Beakers para preparación de muestras.
- Balones volumétricos.
- Balanza marca Adventurer™ OAUS con precisión 0.01 gr.
- Espectrofotómetro Helios Gamma. U.V.-Visible de la marca Cole Parmer.
- Microscopio binocular marca Ecko.
- Incubadora marca WTBinder.
- Autoclave horizontal marca EASTERN modelo EA -620 T.
- Shaker marca New Brunswick Science.
- Agitador magnético con calentamiento marca Barnsted/Thrmolyne corporation.
- Horno Jeiotech OF-026.
- Bomba de vacío marca BUCHNER

- Lámpara ultravioleta T U.V. 15W/G15T8 de Philips de longitud de onda 295 n.m..

3.2 MICROORGANISMOS

Se trabajó con el efluente de una empresa de tintorería y/o lavandería, ubicada en Dosquebradas, Risaralda, de donde se aislaron los microorganismos que posteriormente se usaron para degradar la materia orgánica presente en el agua y trazas de colorante. Dichos microorganismos se fueron depurando de acuerdo con la presión de selección al aumentar la cantidad de agua residual en el medio de cultivo sólido.

Las características del agua residual corresponden a los datos históricos relacionados con la caracterización de los vertimientos de la empresa en estudio, realizada en una integración de 12 horas tomando muestras cada media hora, mostrada en el Anexo II.

3.3 ENSAYOS PRELIMINARES PARA EL AGUA RESIDUAL

Todas las pruebas fueron realizadas en el laboratorio de Biotecnología de la Universidad EAFIT de la ciudad de Medellín.

Estos ensayos se realizaron con el fin de encontrar variaciones en el agua residual sometida a procesos de esterilización requeridos para la adaptación de las cepas.

Se evaluaron dos procesos, el primero de ellos consistía en filtrar el agua residual con un filtro de 0.4 μm , empleando una bomba de vacío para filtración BUCHNER. Este ensayo se realizó con instrumentación estéril para evitar contaminación del medio. En el segundo proceso, los medios de cultivo

sólidos para la etapa de siembra en caja Petri se prepararon con el agua residual, para luego someterlo al proceso de autoclavado y verificar la esterilidad del medio de cultivo. Posteriormente, surge la necesidad de saber qué características podían ser alteradas ante la opción de no esterilizar el agua residual. Se hicieron barridos espectrales y mediciones de la DQO antes y después de la esterilización (autoclavado) del agua para verificar cambios en la variable bajo estudio.

3.4 MEDIOS DE CULTIVO

Para la primera etapa del aislamiento se utilizaron tres medios de cultivo, con el fin de encontrar una amplia variedad de microorganismos y poder estudiar el crecimiento de los mismos. Los agares fueron: Agar Nutritivo, Agar Sabouraud y Agar Ogy.

Se escogieron estos agares ya que presentan un rango más amplio de crecimiento de microorganismos como bacterias, hongos y levaduras.

Para ensayos posteriores relacionados con la identificación preliminar de los microorganismos obtenidos en la primera etapa del aislamiento, se utilizaron los siguientes agares:

- Cetrimide, compuesto por peptona de gelatina (20 g/L), cloruro de magnesio (1.4 g/L), sulfato potásico (10 g/L), N-cetil-N,N,N-trimetiamoniobromuro (0.3 g/L), agar-agar (13 g/L) glicerina como aditivo (10 mL/L) (Pajares y O, 2007).
- Agar P, también llamado King A, compuesto por peptona de gelatina (20 g/L), sulfato de potasio (10 g/L), cloruro de magnesio (1.4g/L) y agar-agar (15 g/L) (Anónimo 1, 2007).

- Agar F, también llamado King B, compuesto por tripteína (10 g/L), peptona de carne (10 g/L), fosfato dipotásico (1.5 g/L), sulfato de magnesio (1.5 g/L) y agar-agar (15 g/L) (Anónimo 2, 2007).

Los medios de cultivo fueron previamente esterilizados a 120 °C y 15 psig por 15 minutos en la autoclave horizontal.

Al cambiar el cultivo en sólido por cultivo en líquido se utilizaron caldo nutritivo y caldo Sabouraud, teniendo en cuenta que ya habían microorganismos que no se adaptaron ante el aumento de la cantidad de agua residual en los medios de cultivo sólidos. Las composiciones de los caldos fueron:

- Nutritivo, compuesto por peptona de carne (5 g/L) y extracto de carne (3 g/L) inicialmente (Merck, 1996).
- Sabouraud, compuesto por (+) Glucosa (40 g/L) y peptona universal (10 g/L) inicialmente (Merck, 1996).
- Ogy, compuesto por extracto de levadura (5 g/L), D(+) Glucosa (10 g/L) y Oxitetraciclina (0.1 g/L) inicialmente (Merck, 1996).

3.5 AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS

Los microorganismos se aislaron del efluente de la empresa estudiada. Para esto se utilizó la técnica de las diluciones en serie y sembrado en superficie.

3.5.1 Método de la dilución en serie

Teniendo en cuenta que en la dilución seriada hay una disminución progresiva de la concentración de una sustancia conservando una magnitud

constante, en este caso de estudio eso quiere decir que la muestra original (efluente) tiene una concentración de 10^0 ; si se toman $100 \mu\text{L}$ de este y se trasladan a $900 \mu\text{L}$ de agua estéril la nueva concentración será de 10^{-1} ; esta nueva concentración se agita en el vórtex para la posterior transferencia de $100 \mu\text{L}$ de esta muestra a $900 \mu\text{L}$ de agua estéril y así tener una concentración de 10^{-2} y así sucesivamente hasta llegar a una concentración de 10^{-6} . Para el aislamiento de los microorganismos se utilizaron las diluciones de 10^0 , 10^{-2} , 10^{-4} y 10^{-6} (Madigan *et al.*, 1999).

3.5.2 Sembrado en superficie

Para esta siembra, se tomaron $100 \mu\text{L}$ de la muestra de cada dilución que fueron inoculados a las cajas Petri que contenían 20 mL de los medios de cultivo, ya mencionados anteriormente (Agar nutritivo, Ogy y Sabouraud). Dichos medios fueron previamente esterilizados a 121°C y 15 psi y posteriormente las cajas fueron llevadas a la incubadora a 30°C como mínimo por dos días.

Al obtener crecimiento de las colonias en las cajas, el paso siguiente fue tomar las colonias individualmente y sembrarlas en los medios de cultivo específicos, de manera que cada cepa fuera única en su caja. Esto se hizo mediante el método de siembra tipo francés (Madigan *et al.*, 1999) Nuevamente las cajas fueron llevadas a la incubadora a 30°C . Adicionalmente, se hizo control de contaminación de la cámara que consistía en dejar una caja Petri abierta mientras se realizaba el proceso de sembrado en la cámara de flujo laminar. Se realizó también el control de contaminación del medio de cultivo, que consistía en servir en medio en la caja Petri dentro de la cámara de flujo laminar, pero sin inocular ningún microorganismo.

3.6 PRESERVACIÓN DE LAS CEPAS AISLADAS

Para asegurar el mantenimiento de las cepas que se aislaron, se sembraron en sus agares donde originalmente crecieron, se incubaron y finalmente se guardaron a -4 °C, hasta agotar existencias (alrededor de 15 días).

Los ensayos de aislamiento se realizaron por duplicado; esto con el fin de cerciorarse del mantenimiento de las cepas y que su recolección fuera segura.

3.7 PROCEDIMIENTOS MICROBIOLÓGICOS PARA IDENTIFICACIÓN PRELIMINAR

Estas técnicas se utilizaron con el fin de poder comenzar una clasificación, caracterización y depuración inicial de los microorganismos. Lo anterior quiere decir que después de tener los aislamientos se les realizó a todos un análisis cualitativo en el que se tenía en cuenta la morfología, forma de crecimiento y color, esto con el objetivo de observar similitudes entre ellos y poder empezar el descarte de los que fueran iguales.

3.7.1 Tinción de Gram

Este ensayo se utiliza para diferenciar las bacterias Gram positivas de las Gram negativas. Mediante este método las bacterias Gram positivas quedan de un color azul violeta y las Gram negativas quedan de un color rojizo. Se realizó la tinción de Gram (Madigan *et al.*, 1999) para todos los aislamientos (Anexo III).

3.7.2 Prueba de la catalasa

Con el asa bacteriológica se tomó una pequeña porción de cada una de los diferentes aislamientos para frotarla en su respectivo portaobjetos limpio y seco. Luego se les añadió una gota de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 30% en la porción de colonia puesta en el portaobjetos. La formación de burbujas de gas indica que la prueba es positiva. (Koneman *et al.*, 1997).

3.7.3 Prueba de la oxidasa

Con el asa bacteriológica se tomó una pequeña porción de cada unas de las cepas y se frotaron en el papel indicador respectivamente. La coloración púrpura del papel es indicativa de que la prueba es positiva (Koneman *et al.*, 1997).

3.7.4 Siembra en agar F, agar P y Cetrimide

Para una posible identificación de *Pseudomonas* se sembraron todos los aislamientos que dieron como resultado Bacilo Gram negativo en la prueba de la tinción. Se tuvo en cuenta que un resultado positivo en el agar F, era la aparición de un color amarillo fluorescente al poner la caja Petri a la luz ultravioleta. De igual manera se tuvo en cuenta que un resultado positivo en el agar P, consistía en la aparición de un color azul sobre el agar. Para el agar Cetrimide se observó el potencial de crecimiento sobre el agar (Jaramillo *et al.*, 2006)

3.8 TÉCNICAS ANALÍTICAS UTILIZADAS EN EL PROYECTO

3.8.1 Método de Lowry para determinación de proteínas

Para esta medición se tomaron muestras de 2.5 mL y se centrifugaron a 4500 rpm por 15 minutos. Los sobrenadantes se sacaron y cada pellet fue resuspendido en una misma cantidad de agua desionizada (2.5 mL); posteriormente, cada muestra fue agitada en el vórtex por 10 segundos y nuevamente se llevaron a la centrifuga por 15 minutos a 4500 rpm. Este procedimiento se hizo dos veces con cada una de las muestras, esto con el fin de lavar muy bien las células y poder determinar la concentración de proteína celular. Para esto se hizo la lectura de OD a 750 n.m., según el protocolo descrito en la prueba de lowry (Anexo IV).

El método de Lowry (1951) es un método colorimétrico de valoración cuantitativa de las proteínas. A la muestra se añade un reactivo que forma un complejo coloreado con las proteínas, siendo la intensidad de color de la disolución resultante proporcional a la concentración de proteínas, según la ley de Lambert-Beer (Lowry *et al.*, 1951)

3.8.2 Medición de DQO

Este análisis se llevó a cabo tomando un volumen de 2.5 mL de una dilución 1:100 de cada uno de los sobrenadantes que resultaron de la centrifugación de las muestras de las cinéticas requeridas en el proyecto y que son detalladas posteriormente. Cada volumen tomado de los sobrenadantes fue vertido en un tubo de ensayo lavado previamente con ácido sulfúrico (H_2SO_4) al 20%; posteriormente se añadieron 1.5 mL de la solución digestora de dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) con una concentración de 0.0167 M y 3.5 mL del reactivo de ácido sulfúrico que consiste en una relación de 5.5 g Ag_2SO_4 /Kg H_2SO_4 . El complejo fue trasladado a la mufla y se mantuvo una temperatura de 150 °C

por dos horas. Después de que las muestras se enfriaron, se titularon utilizando como solución indicadora la ferroína y una solución de FAS (sulfato de amonio) 0.1M como titulante. Para este ensayo también fue necesario tener un blanco que consistió en 2.5 mL de agua destilada adicionada con el resto de los reactivos mencionados anteriormente (APH *et al.*, 1992).

Paralelamente al procedimiento anterior, se realizó una calibración del FAS en la que a 5 mL de la solución digestora se le agregó ferroína (indicador) para ser titulado. Para calcular el valor numérico de la DQO se utilizó la ecuación 1: (APH *et al.*, 1992)

$$DQO = \frac{(A - B) * M * 8000 * f}{mL \text{ muestra}} \quad \text{Ecuación 1 (APH et al., 1992)}$$

$$M = \frac{5 \text{ mL de solución digestora}}{mL \text{ FAS en titulación}} \quad \text{Ecuación 2 (APH et al., 1992)}$$

Donde:

M: Concentración del FAS,

A: mL de FAS en titulación del blanco

B: mL de FAS en titulación de la muestra

f: Factor de dilución.

3.9 ADAPTACIÓN Y SELECCIÓN DE MICROORGANISMOS

3.9.1 Ensayos de adaptación de cepas microbianas

Como se mencionó anteriormente, los ensayos para la selección de microorganismos correspondieron a la técnica de adaptación por presión que se comenzaron en cultivo sólido preparando el medio con un aumento

inicialmente del 10% en la cantidad de agua residual, es decir, que al preparar 100 mL de medio de cultivo, 90 mL eran agua destilada y 10 mL eran de agua residual, manteniendo constante la cantidad de nutrientes. Posteriormente, se esterilizaba en el autoclave y finalmente se trasladaban a la incubadora para que empezaran su crecimiento. Los ensayos se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Ensayos de adaptación en cultivo sólido

ENSAYO	AGUA RESIDUAL (%)	AGUA DESTILADA (%)	AISLAMIENTOS
1	10	90	Las seleccionadas en cada ensayo según la presión de la concentración del agua residual.
2	20	80	
3	30	70	
4	40	60	
5	50	50	
6	60	40	

Posteriormente, se pasó a siembra en líquido, en la cual se tomaron 3 asadas de la respectiva cepa para ser inoculadas en el caldo; se sirvieron 50 mL de caldo en erlenmeyer de 250 mL, con una velocidad de agitación de 200 rpm. De esta manera el proceso de adaptación en líquido se inicia con una concentración de agua residual del 70%. Para el posterior ensayo, es decir, al preparar el caldo con la concentración de 80% de agua residual, se empezó a disminuir la cantidad de nutrientes; lo anterior quiere decir que para aumentar la velocidad de la adaptación por presión se empezaron a variar dos parámetros como eran cantidad de nutrientes y porcentaje de agua residual. En la tabla 6 se muestran los ensayos de adaptación. En este punto ya se tenían 4 aislamientos en caldo Sabouraud, 5 aislamientos en caldo nutritivo y 3 aislamientos en caldo Ogy.

Los cálculos de cantidad de agua requerida en la preparación de los caldos se hacen con base en lo siguiente:

$$\#cepas \times 2 \times 50mL = mL_totales$$

Ecuación 3

Luego se saca el respectivo porcentaje para ver qué cantidad de agua residual se requiere en la preparación de dicho caldo.

Tabla 6. Ensayos de adaptación para siembra en líquido.

% AGUA RES*	% CALDO**	NUTRIENTES (g)				
		C.Sab		C. Nut	C. Ogy	
80	95	Glc: 15.2	Pep: 3.8	3.8	Glc: 1.9	E.lév: 0.95
90	50	8	2	2	1	0.5
100	25	4	1	1	0.5	0.25

*% AGUA RES= Porcentaje de agua residual utilizada en la preparación del caldo. **% CALDO= Porcentaje de introducción de nutrientes al caldo de crecimiento.

3.9.2 Selección de microorganismos

Para el descarte inicial de microorganismos, se tuvieron en cuenta las pruebas bioquímicas realizadas inicialmente y después la adaptación por presión, al ir aumentando el porcentaje de agua residual y/o la disminución de nutrientes; finalmente para seleccionar un único microorganismo de trabajo, se requirió hacer cinéticas de degradación por 40 horas, tomando muestras cada ocho horas. Los ensayos se realizaron por duplicado en erlenmeyer de 250 mL a 200 rpm; los caldos fueron preparados por dos métodos: sin esterilizar y esterilizados (autoclavados a 121°C y 15 psig), soportadas por las pruebas de DQO y Lowry. Para estas últimas pruebas los microorganismos ya estaban adaptados a un crecimiento en agua residual únicamente y con un 25% de los nutrientes requeridos, esto quiere decir que el caldo Sabouraud, compuesto por glucosa y peptona, tenían una concentración de 10 y 2.5 g/L respectivamente.

3.10 ENSAYO DE ESTERILIDAD

Este ensayo se planteó para corroborar la necesidad o no, de esterilizar el agua residual que sería usada para la elaboración del caldo en donde se inocularían los microorganismos; lo anterior se tuvo en cuenta para la investigación ya que la necesidad de una autoclave aumenta significativamente los costos del tratamiento. Este ensayo se propuso para los aislamientos seleccionados hasta el momento y determinar, finalmente, si existían diferencias significativas en ellos ante la propuesta de continuar sin esterilizar el agua.

3.11 CINÉTICAS DE DEGRADACIÓN PLANTEADAS

3.11.1 Cinética para el ensayo de esterilidad

La preparación de los preinóculos en estos ensayos partió de los tratamientos anteriores de los que se transferían 2.5 mL de dicha fermentación al nuevo caldo de 50 mL, el cual se dejó por 24 horas a 200 rpm. Estos ensayos se hicieron por duplicado en erlenmeyer de 250 mL. Posteriormente, se hizo una cinética por 24 horas, en la cual se tomaron muestras cada tres horas y con estos puntos se procedió a medir el contenido de material orgánico degradado en el tiempo mediante el análisis de DQO.

3.11.2 Cinética para la selección del microorganismo

Se preparó un preinóculo de 24 horas partiendo de las fermentaciones en las que se esterilizó el caldo y se tomó un volumen de 2.5 mL para ser inoculados en 50 mL de caldo fresco. Se utilizaron erlenmeyer de 250 mL y una velocidad de agitación de 200 rpm. Se tomaron muestras cada 3 horas

por 24 horas. Con las muestras recolectadas se procedió a realizar el ensayo de DQO para observar qué aislamiento tuvo la mejor remoción.

3.11.3 Cinéticas para el mejoramiento del medio de cultivo

El preinóculo se preparó de la misma manera como se preparó para la cinética de la selección del microorganismo, pero en este caso se tomó un volumen de 10 mL de las fermentaciones para inocularlos en 200 mL de caldo fresco. Se utilizaron erlenmeyer de 500 mL y se tomaron muestras cada 3 horas por 24 horas.

En una primera cinética, se variaron la concentración de glucosa en 1, 3 y 10 g/L y velocidades de agitación en 100, 150 y 200 rpm, manteniendo la concentración de peptona constante en 2.5 g/L.

En la segunda cinética, al haber encontrado la mejor concentración de glucosa y tener, de igual manera, las mejores condiciones con una velocidad de agitación, se comenzó la variación de la concentración de peptona en 0.5, 1.5 y 2.5 g/L.

Con las muestras obtenidas de las cinéticas, se procedió a realizar las DQO correspondientes para observar su porcentaje de reducción.

3.12 BLANCO DE DEGRADACIÓN

Se preparó un blanco de degradación con las condiciones finales de operación sin inocular el microorganismo de trabajo para verificar si la biodegradación correspondía mayoritariamente a los microorganismos presentes en el agua sin esterilizar o al microorganismo inoculado.

3.13 DISEÑOS DE EXPERIMENTOS PLANTEADOS

3.13.1 Diseño de experimentos para escogencia de los microorganismos y pretratamiento con o sin esterilización

Se desarrolló un diseño de experimentos en el que los factores fueron aislamiento (con 4 niveles) y pretratamiento (con 2 niveles: con esterilización y sin esterilización), y como variable de respuesta se tenía porcentaje de remoción de DQO. El análisis estadístico se realizó luego de verificar la normalidad de los datos en el programa Statgraphics 5.1 por el método del análisis ANOVA y test de rangos múltiples (método LSD), con un nivel de confianza del 95%, los cuales son útiles para determinar si existen diferencias significativas en la variable de respuesta.

3.13.2 Diseño de experimentos para elegir el microorganismo de estudio y pretratamiento con o sin esterilización

Para este ensayo, se desarrolló un diseño de experimentos factorial, cuyo factor de estudio fue aislamiento (con 2 niveles) y pretratamiento (con 2 niveles: con esterilización y sin esterilización), y la variable de respuesta fue porcentaje de remoción de la DQO. El análisis estadístico se realizó luego de verificar la normalidad de los datos en Statgraphics 5.1 por el método del análisis ANOVA y test de rangos múltiples (método LSD), con un nivel de confianza del 95%, los cuales son útiles para determinar si existen diferencias significativas en la variable de respuesta.

3.13.3 Diseño de experimentos para el mejoramiento de la concentración de glucosa y velocidad de agitación

En este ensayo, se desarrolló un diseño de experimentos factorial, cuyo factor de estudio fue la concentración de glucosa con 3 niveles (1, 3, 10 g/L) y velocidad de agitación con 3 niveles (100, 150 y 200 rpm), y la variable de respuesta fue porcentaje de remoción de la DQO. El análisis estadístico se realizó luego de verificar la normalidad de los datos en Statgraphics 5.1 por el método del análisis ANOVA y test de rangos múltiples (método LSD), con un nivel de confianza del 95%, los cuales son útiles para determinar si existen diferencias significativas en la variable de respuesta al variar la velocidad de agitación y la concentración de glucosa.

3.13.4 Diseño de experimentos para el mejoramiento de la concentración de peptona

Para la optimización de la concentración de peptona se realizó un diseño de experimentos factorial (concentración de peptona) de 3 niveles (0.5, 1.5 y 2.5 g/L) y una variable de respuesta (remoción de la DQO). El análisis estadístico se realizó luego de verificar la normalidad de los datos en el mismo software de los diseños anteriores, por el método de varianza ANOVA y el test de rangos múltiples (método LSD), con un nivel de confianza del 95%, que sirve para comparar si hay diferencias significativas entre el factor y la variable de respuesta.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 ENSAYOS PRELIMINARES PARA EL AGUA RESIDUAL

4.1.1 Ensayo de esterilización

Para los ensayos preliminares relacionados con el proceso de filtración con el filtro de 0.4 micras no se obtuvo un resultado positivo, ya que a pesar de que se realizó en condiciones estériles, el medio que se preparó con el agua filtrada presentó crecimiento de diversas bacterias procedentes del agua residual. Esto se debió a que probablemente los microorganismos pasaron a través del papel de filtro por tener un tamaño inferior (0.4μ) al del poro. Según reportes en la literatura, las bacterias tienen células con diámetros entre 0.2 y 0.5 micras, y cuando están en medios con bajas fuentes de carbono tienden a reducir aún más su tamaño y variar su forma celular (Coto, 2000). Hay que tener en cuenta también que por un tamaño de poro de 0.4 micras pueden pasar dos tipos de microorganismos, como son las bacterias y los virus, siendo estos últimos muy selectivos (Coto, 2000); pero los medios utilizados en la investigación son ricos para el crecimiento de bacterias, hongos y levaduras, por lo tanto se puede decir que lo que creció fueron bacterias. En la Tabla 7 se muestran los resultados de los ensayos iniciales para el agua residual.

Tabla 7. Resultados de los ensayos iniciales para el agua residual

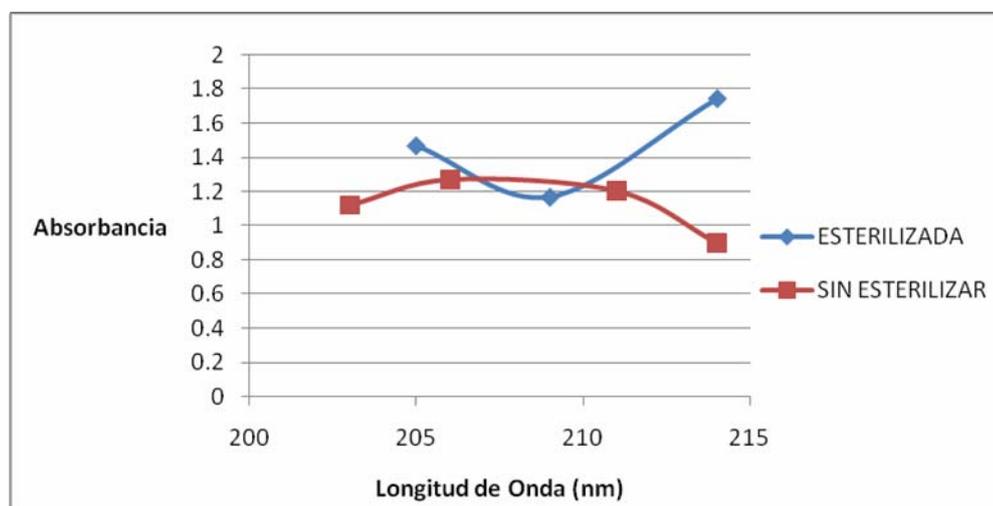
PROCESO	DETALLES	RESULTADO
Filtración	Tamaño de poro de 0.4 micras	Contaminación por bacterias y levaduras
Autoclavado	Temperatura=121° C y Presión= 15 psig	No contaminación

Por lo expuesto anteriormente, todas las siembras en sólido tuvieron que ser preparadas con el medio esterilizado con calor.

4.1.2 Ensayo para verificar cambios tras autoclavado del agua

Las aguas provenientes de la planta se sometieron a procesos de esterilización para diferenciar cambios en estas antes y después del mismo. Se utilizó un barrido espectral en la zona ultravioleta (200 a 400 nm realizado en el espectrofotómetro Helios Gamma UV-Visible marca Cole Parmer) para mirar la incidencia del proceso en los compuestos presentes en el agua y de la Gráfica 1 se observa que la curva absorbancia Vs. Longitud de onda varía de forma significativa. Se puede decir que estas variaciones se deben a la posible presencia de compuestos termolábiles que tras procesos que aportan calor pueden formar intermedios u otros compuestos diferentes a los iniciales.

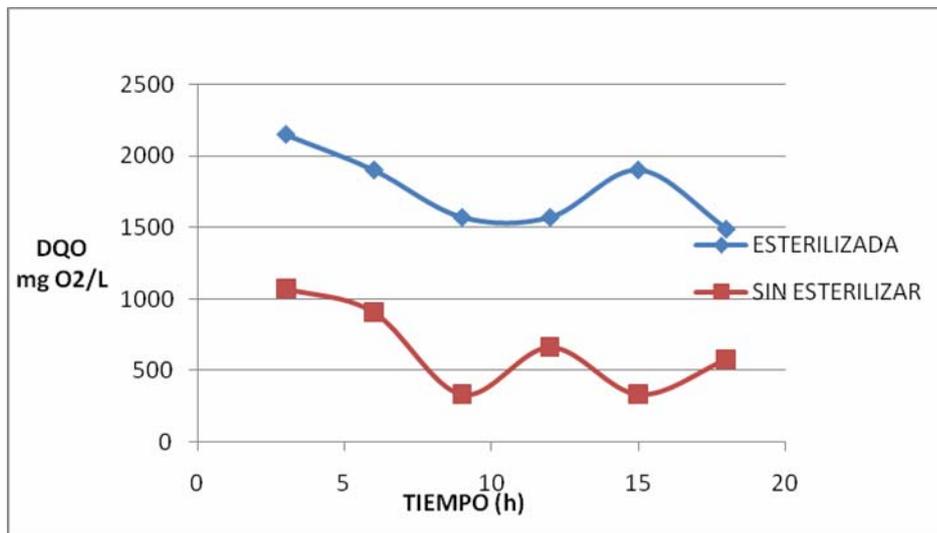
Gráfica 1. Absorbancia Vs. Longitud de Onda para verificar cambios con la esterilización del agua.



Otro ensayo realizado fue la medición de DQO en el tiempo al agua residual esterilizada y sin esterilizar, sin inóculo, para verificar cambios debidos al tratamiento. Se muestra que el proceso de esterilización tiene cierta incidencia en el valor de la Demanda Química de Oxígeno ya que los valores

de esta se encontraban cerca de 1000 g O₂ por encima de los valores para el agua sin esterilizar, esto se puede deber a la presencia de compuestos en el agua esterilizada que requieren más oxígeno para su degradación generados a partir de la esterilización. (Gráfica 2)

Gráfica 2. Demanda Química de Oxígeno Vs. Tiempo para verificar cambios con la esterilización del agua.



4.2 RESULTADOS DEL AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS

Tabla 8. Resultados de algunas características morfológicas y de crecimiento de los aislamientos obtenidos.

DILUCIÓN	CRECIMIENTO	MORFOLOGÍA
10 ⁰	****	Colonia ocre, amarilla redonda lisa y colonia blanca, rosada clara, amarilla rugosa.
10 ⁻¹	****	Colonia ocre, amarilla redonda lisa, colonia blanca y colonia rosada redonda grande, masa transparente, masa crema, amarilla rugosa.
10 ⁻²	***	Masa crema, colonia ocre, amarilla redonda lisa, colonia blanca y colonia rosada redonda grande, blanca rugosa.
10 ⁻³	**	Colonia ocre, amarilla redonda lisa, colonia blanca y colonia rosada redonda grande, colonias crema
10 ⁻⁴	*	Colonia ocre, amarilla redonda lisa, colonia blanca y colonia rosada oscura, redonda.
10 ⁻⁵	*	Amarilla ocre aislada y rosada aislada, colonia crema aislada.
Control cámara	Sin contaminación	-----
Control medio	Sin contaminación	-----

**** Mucho crecimiento; *** Mediano crecimiento; ** Poco crecimiento; *Muy bajo crecimiento.

Como se puede observar en la Tabla 8, hubo crecimiento de diversos microorganismos en todas las diluciones. A medida que aumentó el factor de dilución las colonias se podían apreciar más diferenciadas, ya que muchas en las primeras diluciones estaban superpuestas o muy esparcidas en la caja Petri lo que dificultaba su separación. De acuerdo con lo anterior, se puede observar también que en la dilución de 10⁻⁵ las diferentes colonias se presentaron prácticamente aisladas por completo.

Cabe anotar que aunque los colores de las colonias encontradas fueron amarillas, rosadas, cremas, blancas y transparentes, existían ciertos factores como la forma de crecimiento que fue en algunos casos muy diferente, lo que llevaba a hacerles más pruebas a todas por más parecidas que fueran y así tener la certeza que se trataba del mismo microorganismo o que fueran diferentes.

En otros casos en los que las colonias sí se encontraban más diferenciadas se pudo lograr que mediante observaciones cualitativas pudiera empezar el aislamiento de cepas similares por morfología, crecimiento, tamaño y color. Cabe mencionar que todos los microorganismos crecieron en agar nutritivo, ya que es un medio muy rico en nutrientes pero no es selectivo. (Franco *et al.*, 2008). Adicionalmente es importante aclarar que la selección de los microorganismos aptos para la biodegradación se realizó por medio de la presión de selección es decir los diferentes microorganismos solo se descartan si perdían la capacidad de crecimiento y degradación al aumentar la concentración del agua residual.

Se tuvo en cuenta también la importancia de tener el control en cámara y en el medio de cultivo; allí no hubo crecimiento de ningún microorganismo, lo que corrobora que los aislamientos sí provenían del agua residual.

Cuidadosamente se trasladaron de las Cajas Petri correspondientes las colonias aisladas que no tuvieran contacto con ninguna otra y fueron puestas en un nuevo medio sembradas mediante el método de repique por agotamiento para la purificación. En la Tabla 9 se pueden observar los resultados.

Tabla 9. Microorganismos aislados en el proceso

ASL	Forma	Superficie	Color	Diámetro (mm)	Medio cultivo	Crecimiento
ASL 1	Masa	Lisa	Transparente	_____	A. Ogy	Poco, aislado y radial
ASL 2	Redonda	Lisa	Crema	3-4	A. Ogy	Separado por colonias
ASL 3	Masa	Rugosa	Crema	_____	A. Ogy	Aglomerado radial
ASL 4	Masa	Lisa	Ocre	_____	A. gy	Separado por colonias
ASL 5	Masa	Lisa	Rosada clara	_____	A. Ogy	Poco y aglomerado
ASL 6	Redonda	Lisa	Blanca	2-3	A. Ogy	Colonias separadas
ASL 7	Masa	Lisa	Transparente-opaco	_____	A. Ogy	Aglomerado lineal
ASL 8	Redonda	Lisa	Transparente	3-4	A. Nut	Poco y separado
ASL 9	Redonda	Rugosa	Amarilla	2-3	A. Nut	Colonias separadas
ASL 10	Redonda	Lisa	Blanca	4-5	A. Nut	Poco, colonias aisladas
ASL 11	Masa	Lisa	Transparente-opaco	_____	A. Nut	Poco y separado
ASL 12	Redonda	Lisa	Amarilla	3-4	A. Nut	Poco y separado
ASL 13	Masa	Lisa	Blanca	_____	A. Nut	Colonias separadas
ASL 14	Redonda	Lisa	Blanca	7-8	A. Nut	Mucho y aglomerado
ASL 15	Redonda	Lisa	Amarilla	3-4	A. Sab	Crecimiento separado
ASL 16	Redonda	Lisa	Ocre	3-4	A. Sab	Separado por colonias
ASL 17	Masa	Lisa	Blanca	_____	A. Sab	Aglomerado y radial
ASL 18	Masa	Lisa	Crema	_____	A. Sab	Aglomerado lineal
ASL 19	Redonda	Lisa	Rosada	8-9	A. Sab	Separado por colonias
ASL 20	Redonda	Rugosa	Blanca	3-4	A. Sab	Poco y separado

ASL: Aislamiento A. Nut: Agar Nutritivo A. Sab: Agar Saboraud

En el transcurso de separación de colonias individualmente en las cajas Petri, se obtuvieron 20 aislamientos que fueron nombrados con números del 1 al 20 y de esta manera tener un patrón de identificación. Aunque algunas de las colonias pudieron ser diferenciadas unas de otras fácilmente,

hubo otras que aunque tenían similitudes presentaban una que otra disparidad, y por consiguiente debían seguir siendo sembradas y analizadas independientemente. Con lo anterior, se quiere aclarar que muy probablemente dentro de los 20 aislamientos, algunos podían estar repetidos en otras cajas, por lo que se procedió a realizarles análisis que serán explicados posteriormente.

En la Tabla 9 también se detallan los medios de cultivo en que se encuentran cada uno de los aislamientos; algunas de las colonias de idéntica morfología, color y forma crecieron en los tres medios de cultivo y para seleccionar uno de ellos se tuvieron en cuenta factores como en cuál presentaba un mejor crecimiento y de donde era más fácil separarla que no estuviera superpuesta con otra colonia distinta.

Igualmente, en cada resiembra se hicieron controles de cámara y medio para verificar que no existiera contaminación cruzada y poder asegurar que los microorganismos obtenidos en cada caja Petri provienen del agua residual en estudio.

4.3 RESULTADOS DE LOS PROCEDIMIENTOS MICROBIOLÓGICOS DE IDENTIFICACIÓN PRELIMINAR

Como se mencionó en la metodología, estas pruebas fueron muy útiles para comenzar con una clasificación y selección de los aislamientos, los cuales podían ser eliminados ya que se comprobaba mediante estos ensayos que efectivamente era el mismo microorganismo. Dentro de estos procedimientos se tuvieron en cuenta la tinción de Gram, prueba de la oxidasa y la prueba de la catalasa.

4.3.1 Tinción de Gram

Tabla 10. Resultados de la Tinción de Gram para los microorganismos aislados

MEDIO CULTIVO	AISLAMIENTO	BACILO	COCO	COCO-BACILO	GRAM PROPOSITIVO	GRAM NEGATIVO	
A. Ogy	1	X				X	
	2	X				X	
	3		X			X	
	4	X				X	
	5	X				X	
	6				X	X	
	7	X				X	
A. Nutritivo	8	X				X	
	9			X	X		
	10	X				X	
	11	X				X	
	12	X				X	
	13	X				X	
	14	LEVADURA					
A. Saboraud	15	X				X	
	16		X		X		
	17	X				X	
	18	X				X	
	19	LEVADURA					
	20	X				X	

Agrupando las características encontradas de los aislamientos con los resultados de la tinción de Gram (Tabla 10), se determinó que los microorganismos de trabajo podían clasificarse en 14 bacterianas bacilos Gram negativos, un coco Gram negativo y uno Gram positivo, un coco-bacilo Gram negativo y uno positivo y 2 levaduras, estas últimas se clasificaron de esta forma ya que en la vista al microscopio su tamaño celular era más grande y además no se tuvo resultado a la tinción de gram.

A través de esta tinción se pudo corroborar que los aislamientos 1 y 7 eran similares, ya que contaban con características morfológicas y color muy parecidos, dando como resultado que ambos fueron bacilos Gram negativos. Cabe anotar además, que esta depuración se realizó teniendo en cuenta un solo medio de cultivo, es decir, nunca se eliminó ni se compararon

microorganismos que se encontraran creciendo en medios de cultivo diferentes aunque su morfología fuera similar.

4.3.2 Prueba de Oxidasa y Catalasa

Tabla 11. Resultados de las pruebas de Oxidasa y Catalasa para las cepas descritas

AISLAMIENTO	CATALASA	OXIDASA
3	+	-
4	+	+
6	+	+
8	-	-
9	+	+
10	-	+
13	+	+
15	-	+
16	-	+
18	-	+
20	-	+

Al realizar estas pruebas de identificación ya se había empezado la adaptación de los microorganismos al agua residual, lo que indica que ya varios de ellos no se habían adaptado al proceso de aumento de concentración de agua residual en el medio de cultivo, (aislamientos 2, 5,11, 12 y 17). Con estas pruebas no se eliminó ningún aislamiento, ya que estos ensayos correspondían, únicamente, a ensayos relacionados con el proceso de identificación.

A través de estas pruebas y con la ayuda de la tinción de Gram, se puede tener un acercamiento del género de los microorganismos encontrados (Csuros y Csuros, 1999). Se obtuvo una bacteria coco Gram positivo (aislamiento 16) y la prueba de catalasa fue negativa, entonces puede pertenecer al género de *Streptococcus* (Csuros y Csuros, 1999). De igual manera, se obtuvieron 14 bacilos Gram negativos, de las cuales 6 dieron

positiva a la prueba de la oxidasa (Tabla 11) (aislamientos 4, 10, 13, 15, 18, 20); con los datos anteriores, se puede tener un espacio de identificación más limitado, ya que las bacterias con estas características pueden pertenecer a los géneros *Pseudomonas*, *Alcaligenes* o *Vibrio* (Universidad Complutense, 2007). También hay que tener en cuenta que los aislamientos 4 y 13 dieron positiva la prueba de la catalasa, lo que puede indicar, por otro lado, que pertenezcan al género de *Bacillus spp* (Csuros y Csuros, 1999).

4.3.3 Siembra en agar P, agar F y cetrimide

En estos agares ningún aislamiento dio resultado positivo; aunque estos crecieron un poco por los nutrientes que contenían dichos agares, en ninguna colonia se vio la coloración azul que se debe dar en el agar P, ni la presencia de la coloración amarilla fluorescente (tomada a la longitud disponible 295 nm) en el agar F. Solamente en un caso se podría sospechar que se observó la presencia de *Pseudomonas*, ya que solo una cepa creció en el agar cetrimide (aislamiento 13), que es selectivo para este tipo de microorganismos (Quinchía *et al.*, 2006). Según lo reportado en la literatura, hay buenos indicios para pensar que se trata de este microorganismo, ya que con la tinción de Gram se pudo determinar que era un bacilo Gram negativo y que daba positiva a la prueba de la oxidasa (Maimone, 2004).

4.4 ADAPTACIÓN DE MICROORGANISMOS AL AGUA RESIDUAL

Como se mencionó anteriormente, la adaptación por presión comenzó en sólido hasta tener un 60% de agua residual para la preparación de los medios de cultivo; de ahí en adelante comenzó la adaptación en líquido. En la Tabla 12 se muestran los resultados del proceso de adaptación en sólido.

Tabla 12. Resultados de proceso de adaptación en sólido

AISLAMIENTO	10%	20%	30%	40%	50%	60%	ESTADO
2	X	X	X	X	X	X	D
3	X	X	X	X	X	X	EA
4	X	X	X	X	X	X	EA
5	X	X					D
6	X	X	X	X	X	X	EA
7	X						D
8	X	X	X	X	X	X	EA
9	X	X	X	X	X	X	EA
10	X	X	X	X	X	X	EA
11	X						D
12	X	X					D
13	X	X	X	X	X	X	EA
14	X	X	X	X	X	X	EA
15	X	X	X	X	X	X	D
16	X	X	X	X	X	X	EA
17	X						D
18	X	X	X	X	X	X	EA
19	X	X	X	X	X	X	EA
20	X	X	X	X	X	X	EA

D = Descartada EA = En Adaptación X= Crecimiento

Cuando comenzó la adaptación en sólido, ya el aislamiento 1 se había sido descartado por presentar características similares (tinción, morfología, color) al aislamiento 7; todas las cepas crecieron cuando la preparación del agar consistía en un 10% de agua residual y 90% de agua destilada, pero se eliminaron las que tuvieran menos crecimiento en la caja (aislamientos 7, 11 y 17), ya que todas las cepas fueron sembradas el mismo día y con idénticas condiciones. Se continuó aumentando la concentración de agua residual, correspondiente a la adaptación del 20% en donde los aislamientos continuaron creciendo satisfactoriamente, pero en la adaptación de 30% de agua residual, después de una semana los aislamientos 5 y 12 no mostraron crecimiento, razón por la cual fueron también eliminados.

Desde este punto hasta la adaptación de 60%, las cepas restantes se adecuaron muy bien a las nuevas condiciones, en las que soportaban más agua residual que destilada; únicamente en este punto se eliminó el aislamiento 15, la cual no mostró el crecimiento que llevaba en el transcurso de las adaptaciones con menos agua residual, (Tabla 12). Lo anterior

determina que el aumento de agua residual estresó las células impidiendo su crecimiento.

En este punto se tomó la decisión de continuar la adaptación por presión pero en cultivo líquido, en la cual la cantidad de agua residual se aumentó a un 70% y se inocularon los 12 aislamientos que quedaban hasta ese momento. En esta concentración de agua residual se observó la turbidez del agua de todos los erlenmeyer, algunos desde las 24 horas de cultivo y otros 48 horas después de la inoculación.

Después de 5 días se determinó que todas las cepas habían tenido un crecimiento satisfactorio (turbidez en el medio de cultivo) con este porcentaje de agua residual. Al ver que todavía quedaban muchos aislamientos, se añadió otro factor que los sometería a una presión mayor, ya que para la preparación del caldo con un 80% de agua residual se disminuyó el porcentaje de nutrientes en un 5% menos de lo que dice el protocolo de preparación, (Tabla 13).

Tabla 13. Resultados del proceso de adaptación en líquido

AISLAMIENTOS	70%	80% AR*	-5% N**	90% AR	-50% N	100% AR	-75% N	ESTADO
3	X	X			X			D
4	X	X			X			D
6	X	X						D
8	X	X						D
9	X	X						D
10	X	X						D
13	X	X			X			D
14	X	X			X			D
16	X	X			X	X		EA
18	X	X			X	X		EA
19	X	X			X	X		EA
20	X	X			X	X		EA

D = Descartada EA = En Adaptación *AR: Agua Residual **N: Nutrientes X= Crecimiento

Al comenzar la disminución de porcentaje de nutrientes en un 5% y el aumento de agua residual en un 80%, los aislamientos 6, 8, 9 y 10 tuvieron

que ser eliminados, ya que no mostraron ningún cambio en la turbidez del caldo en donde estaban creciendo, es decir, aproximadamente en 5 días después el caldo se mantuvo sin ninguna opacidad. (Tabla 13)

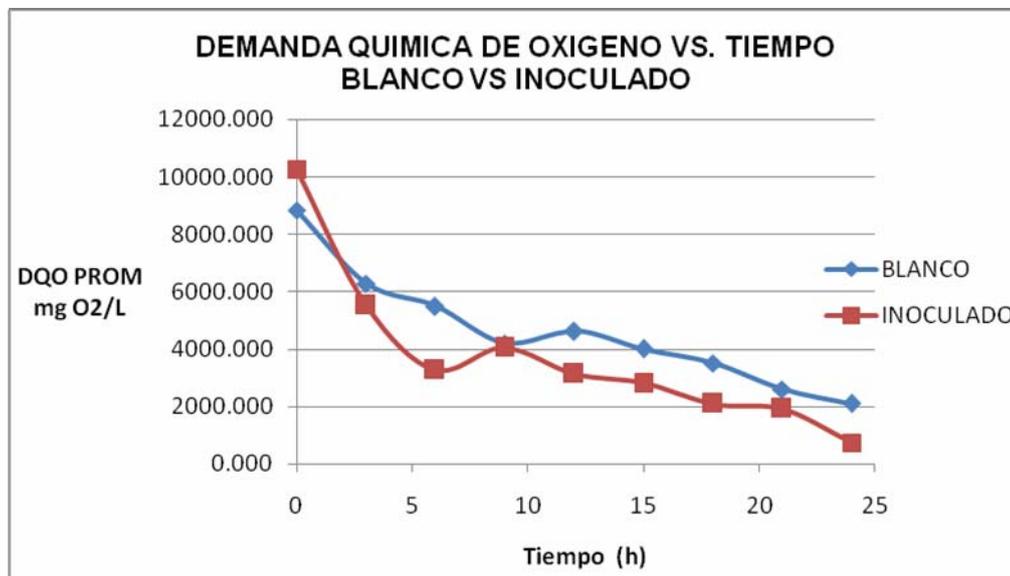
Posteriormente, se preparó el caldo con solo un 50% de los nutrientes aumentando la cantidad de agua residual un 10% más (90% agua residual); en estas condiciones se eliminaron los aislamientos 3 y 4, ya que no mostraron ningún crecimiento con respecto al crecimiento que mostraban las demás aislamientos en este punto, ya que comparativamente los demás caldos en donde estaban creciendo los otros 6 aislamientos se puso turbio en muy poco tiempo, teniendo en cuenta que todas fueron inoculadas al mismo tiempo y a las mismas condiciones de agitación, luz, temperatura y nutrientes.

Finalmente, la adaptación terminó con la preparación de los caldos únicamente con un 25% de los nutrientes que se exponen en el protocolo y con agua residual al 100%. Con estas condiciones únicamente crecieron los aislamientos 16, 18, 19 y 20, y los aislamientos 13 y 14 quedaron eliminados en este punto al no mostrar ningún crecimiento, ya que el caldo donde estaban creciendo se mantuvo igual 5 días después de la fermentación.

4.5 RESULTADOS DEL ENSAYO DEL BLANCO DE BIODEGRADACIÓN

La Gráfica 3 muestra los resultados de la cinética de degradación de DQO para el tratamiento con el microorganismo inoculado (aislamiento 19) y para el blanco de degradación; mediante este ensayo se pudo corroborar la importancia de la inoculación del microorganismo viable, ya que se presentaron mayores porcentajes (92.8%) y velocidades de remoción de la Demanda Química de Oxígeno ante la presencia de este microorganismo que para el blanco de prueba (75.16%).

Gráfica 3. Resultados Demanda Química de Oxígeno para Blanco de Degradación vs Tratamiento con Inoculación.



Aunque en el blanco planteado se presenta reducción de la Demanda Química de Oxígeno (557.68 mg O₂/L-h), este fenómeno se debe al proceso de atenuación natural realizado por los microorganismos presentes en el agua residual; por otro lado, en el tratamiento realizado con la inoculación del microorganismo viable se observa que la velocidad de degradación es aproximadamente el doble (1165.86 mg O₂/L-h) y que la DQO en el tiempo final es menor.

4.6 ANÁLISIS DE LA DEGRADACIÓN DE COLOR

Dentro de este margen de resultados, debe aclararse que no se logró estandarizar un método que permitiera cuantificar la degradación de color, ya que existía interferencia entre la medición de este y la presencia del microorganismo, pues tampoco se consiguió determinar cual o cuales colorantes había presentes. Por lo anterior, todas las decisiones se tomaron

de acuerdo con la reducción de la Demanda Química de Oxígeno, que en últimas es el parámetro más importante que se debe cumplir.

Cabe mencionar además, que se presentan también otras situaciones ajenas a la consecución del proyecto causantes de estas circunstancias y es el no contar con la misma agua residual para todos los ensayos de laboratorio, lo cual deviene por la ubicación de la empresa en otra ciudad, y como consecuencia se dificulta el transporte del agua hasta el sitio de los ensayos y su almacenamiento en las condiciones de temperatura requeridas.

Otro factor a mencionar, es que en la empresa estudiada los procesos químicos involucrados en las prendas son altamente dependientes de fluctuaciones como son los requerimientos del cliente y moda del momento, y por lo tanto no puede asegurarse todos los procesos exijan colorantes. Esto pudo verificarse al ver descargas de distintos procesos diariamente, en las que en algunos casos el agua podía verse coloreada y en otros con menos coloración.

5. DISEÑO DE EXPERIMENTOS

5.1 CINÉTICAS DE DEGRADACIÓN Y CINÉTICAS DE CRECIMIENTO

Se realizó un diseño de experimentos factorial. En este proceso la variable de respuesta es la disminución de la DQO (porcentaje); según lo encontrado en la bibliografía (Izquierdo *et al.*, 2004), hay diversas variables que influyen directamente en la eficiencia del proceso de biodegradación, como la velocidad de agitación, la concentración del cosustrato y el pretratamiento realizado entre otros. Todos tienen efecto, no sólo en el proceso sino también en los costos a la hora de montar una planta de tratamiento dentro de la empresa, por lo que es necesario conocer el comportamiento en la eficiencia del mismo. Adicionalmente, estos parámetros también afectan la producción de biomasa.

5.2 FACTORES BAJO ESTUDIO

Se estudiaron cuatro factores sobre los cuales se tomó una decisión, estos son: velocidad de agitación, pretratamiento realizado (con y sin esterilización en autoclave), concentración de glucosa y peptona, considerados en cuatro experimentos diferentes.

.

Se desarrollaron cuatro diseños de experimentos diferentes, en cada uno se evaluaron diferentes factores como se explica en la Tabla 14, todos los resultados fueron analizados en el software estadístico Statgraphics 5.1.

Tabla 14. Condiciones para los Diseños de experimentos.

Experimento 1					
Microorganismo	Factor 1	Cepa 16	Cepa 18	Cepa 19	Cepa 20
Pretratamiento	Factor 2	Agua Esterilizada		Agua sin Esterilizar	
Concentración de Cosustrato	Constante	Glucosa 10 g/L Peptona 2.5 g/L			
Velocidad de Agitación	Constante	200 rpm			
Experimento 2					
Microorganismo	Factor 1	Cepa 16		Cepa 19	
Pretratamiento	Factor 2	Agua Esterilizada		Agua sin Esterilizar	
Concentración de Cosustrato	Constante	Glucosa 10 g/L Peptona 2.5 g/L			
Velocidad de Agitación	Constante	200 rpm			
Experimento 3					
Microorganismo	Constante	Cepa 19			
Pretratamiento	Constante	Agua sin Esterilizar			
Concentración de Glucosa	Factor 1	Glucosa 10 g/L	Glucosa 3 g/L	Glucosa 1 g/L	
Concentración de Peptona	Constante	Peptona 2.5 g/L			
Velocidad de Agitación	Factor 2	100 rpm	150 rpm	200 rpm	
Experimento 4					
Microorganismo	Constante	Cepa 19			
Pretratamiento	Constante	Agua sin Esterilizar			
Concentración de Glucosa	Constante	Glucosa 3 g/L			
Concentración de Peptona	Factor 1	Peptona 2.5 g/L	Peptona 1.5 g/L	Peptona 0.5 g/L	
Velocidad de Agitación	Constante	100 rpm			

5.2.1 Niveles del factor

- **Pretratamiento:** Agua residual esterilizada en autoclave (Ensayo 1) y Agua

residual sin esterilizar (Ensayo 2).

- **Velocidad de Agitación:** 100 rpm, 150rpm y 200rpm.
- **Concentración de Glucosa:** 10 g/L, 3 g/L y 1 g/L.
- **Concentración de Peptona:** 2.5 g/L, 1.5 g/L y 0.5 g/L

5.2.2 Variables de respuesta

La primera variable de respuesta elegida fue el porcentaje de remoción de la DQO, debido a que es un parámetro importante que indica si el proceso de biodegradación se está llevando a cabo.

La segunda variable de respuesta elegida fue concentración de proteína celular, medida por medio del método de determinación de proteínas de Lowry explicado en la metodología para cinéticas de crecimiento, como método indirecto de crecimiento celular

5.2.2.1 Unidad experimental: Agua residual más medio de cultivo (cosustrato) y microorganismos.

- Número de réplicas: tres (3).
- Nivel de significación (α): 0.05

5.2.2.2 Descripción: Diseño experimental de efectos Fijos. Modelo balanceado que no cuenta con restricciones de aleatoriedad.

5.3 HIPÓTESIS

5.3.1 Hipótesis nula (H_0): $\mu_A = \mu_B = \mu_C \dots = \mu_x$

No hay efecto del factor bajo estudio sobre la variable de respuesta.

5.3.2 Hipótesis alterna (Ha): $\mu_A \neq \mu_B \neq \mu_C \dots \neq \mu_x$

Si hay efecto del factor bajo estudio sobre la variable de respuesta.

5.4 EFECTO DEL TIPO DE MICROORGANISMO (CEPA 16, 18, 19 Y 20) Y DEL PRETRATAMIENTO SOBRE LA BIODEGRADACIÓN.

5.4.1 Efecto del tipo de microorganismo sobre el tratamiento de biodegradación

Al terminar el proceso de adaptación de los microorganismos al agua residual y la reducción del medio de cultivo se obtuvieron cuatro microorganismos viables 16, 18, 19 y 20, en esta etapa se planteó un diseño de experimentos que permitió concluir qué microorganismo era el más viable para su implementación en el proceso de biodegradación.

Tabla 15. ANOVA para la disminución de la DQO por tipo de Microorganismo.

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	4.54E+03	3	1.51E+03	3.92	0.0366
Intra grupos	4.63E+03	12	3.86E+02		
Total (Corr.)	9.17E+03	15			

Puesto que en el análisis de varianza, Tabla 15, el P-valor es inferior a 0.05 (P-valor 0.0366), si hay diferencia estadística significativa entre las medias del porcentaje de remoción de la DQO de un microorganismo a otro, esto demuestra la invalidez de la hipótesis nula, es decir, se acepta la afirmación de que sí existe una influencia del factor de tipo de microorganismo sobre el delta en la DQO.

Tabla 16. Test de Rangos Múltiples para la disminución en la DQO por tipo de Microorganismo

AISLAMIENTO	FRECUENCIA	MEDIA	GRUPOS HOMOGENEOS
18	4	45.445	X
20	4	55.985	XX
16	4	83.02	X
19	4	84.0975	X

En el test de rangos múltiples, Tabla 16, se demuestra que hay dos grupos homogéneos, uno conformado por los aislamientos 18 y 20 y otro conformado por los microorganismos 16, 19 y 20, corroborando así que hay diferencias estadísticas entre el tipo de microorganismo a utilizar; esto se explica porque los microorganismos tienen diferente metabolismo así, todos hayan sido adaptados a los contaminantes presente en el agua residual, por tanto, unos pueden remover mayor DQO que otros.

Con el fin de depurar los microorganismos para emplear en la degradación y para comprobar los datos arrojados por Statgraphics 5.1 se analizaron los resultados obtenidos para el porcentaje de reducción de la DQO, mostrados en la Tabla 17.

Tabla 17. Tabla resumen para el porcentaje de remoción de la DQO variando microorganismo y pretratamiento.

ENSAYO 1 ESTERILIZADA		
CEPA	Δ DQO	%REM
16	6609.60	82.64
18	3800.52	36.80
19	7724.97	80.83
20	4709.34	50.89
ENSAYO 2 SIN ESTERILIZAR		
CEPA	Δ DQO	%REM
16	6403.05	83.40
18	5494.23	54.09
19	8262.00	87.37
20	5205.06	61.08

De la Tabla 17 se puede observar que los microorganismos 16 y 19 tienen

mayor porcentaje de remoción de DQO con 82.64% y 80.83% respectivamente, para el ensayo 1 con agua esterilizada, e igualmente la remoción es mayor con 83.4% y 87.37% respectivamente, para el ensayo 2 con agua sin esterilizar. Sin embargo, los porcentajes de remoción obtenidos con cada microorganismo esterilizando y sin esterilizar son muy similares.

Analizando las medias presentadas en la Tabla 16, se muestra que la media de las degradaciones para los microorganismos 16 y 19 es mucho mayor que para los aislamientos 18 y 20, lo que explica que las remociones son mayores en los primeros microorganismos; por lo que estos son seleccionados (16 y 19) para su estudio.

5.4.2 Efecto del tipo de pretratamiento sobre el tratamiento de biodegradación

Igualmente, en esta etapa del proceso se estudió la posibilidad de iniciar el tratamiento de biodegradación con agua residual esterilizada o agua residual sin esterilizar, ensayo 1 y ensayo 2 respectivamente, para estudiar la posibilidad de implementar un proceso más económico, evitando el proceso de esterilización por temperatura y presión dentro de la empresa.

Tabla 18. ANOVA para la disminución de la DQO por tipo de Pretratamiento.

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	3.02E+02	1	3.02E+02	0.48	0.5009
Intra grupos	8.87E+03	14	6.33E+02		
Total (Corr.)	9.17E+03	15			

Puesto que en el análisis de varianza, Tabla 18, el P-valor es superior o igual a 0.05 (P-valor 0.5009), no hay diferencia estadística significativa entre las medias del porcentaje de remoción de la DQO de un pretratamiento a otro, esto demuestra la validez de la hipótesis nula, es decir, se acepta la

afirmación de que no existe una influencia del factor de tipo de pretratamiento sobre el porcentaje de remoción en la DQO, es decir, los resultados son estadísticamente similares si se realiza el proceso esterilizando o sin esterilizar el medio de cultivo.

Tabla 19. Test de Rangos Múltiples para la disminución en la DQO por tipo de Pretratamiento

PRETRATAMIENTO	FRECUENCIA	MEDIA	GRUPOS HOMOGENEOS
E1	8	62.79	X
E2	8	71.4838	X

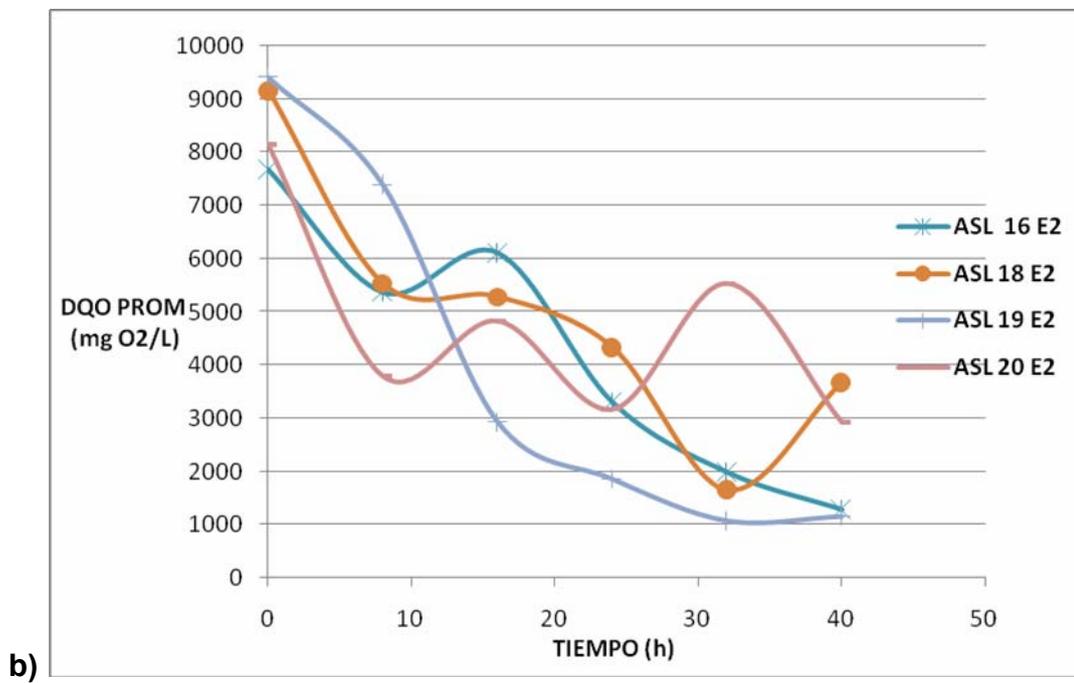
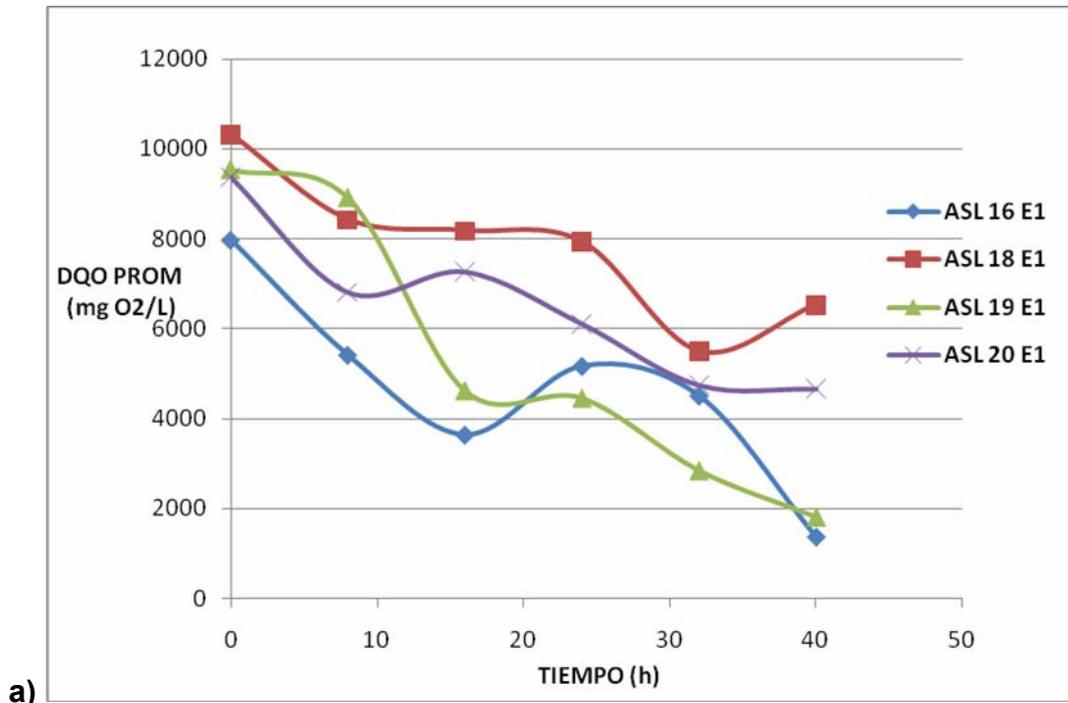
E1: Esterilizado E2: Sin esterilizar

En el test de rangos múltiples, Tabla 19, se demuestra que hay un solo grupo homogéneo, corroborando así que no hay diferencias estadísticas entre el tipo de pretratamiento a utilizar.

De acuerdo con el análisis de la media de los datos arrojados en la Tabla 19, se muestra que la media de la degradación para el ensayo 2 (agua sin esterilizar) es un poco mayor que para el ensayo 1 (agua esterilizada).

La Gráfica 4 a) y b) muestran el comportamiento de la degradación en la DQO para cada uno de los microorganismos en el ensayo 1 (agua esterilizada) y en el ensayo 2 (agua sin esterilizar) respectivamente, como se observa las tendencias de la degradación son muy similares pero las cepas 18 y 20 muestran valores para la DQO superiores a los de las cepas 19 y 16, la mejor degradación para este ensayo se obtiene con el aislamiento 19 iniciando el proceso con agua sin esterilizar (Ensayo 2) seguida por el aislamiento 16 iniciado con el mismo tratamiento.

Gráfica 4. DQO vs Tiempo para aislamiento 16, 18, 19 y 20 para los pretratamientos E1 y E2. a) Aislamientos en ensayo 1. b) Aislamientos en ensayo 2.



ASL: Aislamiento

5.5 EFECTO DEL TIPO DE MICROORGANISMO (AISLAMIENTO 16 Y 19) Y DEL PRETRATAMIENTO SOBRE LA BIODEGRADACIÓN.

5.5.1 Efecto del tipo de microorganismo sobre el tratamiento de biodegradación

Después del primer ensayo de biodegradación surgió la necesidad de analizar en otro ensayo el desempeño de dos microorganismos viables 16 y 19, en esta etapa se planteó un diseño de experimentos que permitió concluir qué microorganismo era el más viable para la implementación en el proceso de biodegradación.

Tabla 20. ANOVA para la disminución en la DQO por tipo de Microorganismo.

Fuente	Sumas de cuad.	GI	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	1.23E+02	1	1.23E+02	1.05	0.33
Intra grupos	1.17E+03	10	1.17E+02		
Total (Corr.)	1.29E+03	11			

Puesto que en el análisis de varianza, Tabla 20, el P-valor es mayor o igual a 0.05 (P-valor 0.33), no hay diferencia estadística significativa entre las medias del porcentaje de remoción de la DQO de microorganismo a otro, esto demuestra la validez de la hipótesis nula, es decir, se acepta la afirmación de que no existe una influencia del factor de tipo de microorganismo sobre el porcentaje de remoción en la DQO, por tanto los aislamientos 16 y 19 presentan una biodegradación similar.

Tabla 21. Test de Rangos Múltiples para la disminución en la DQO por tipo de Microorganismo

AISLAMIENTO	FRECUENCIA	MEDIA	GRUPOS HOMOGENEOS
16	6	77.3383	X
19	6	83.7333	X

En el test de rangos múltiples, Tabla 21, se demuestra que hay un solo grupo homogéneo, corroborando así que no hay diferencias estadísticas entre el tipo de microorganismo a utilizar.

Con el fin de depurar los microorganismos para emplear en la degradación, se analizaron los resultados obtenidos para el porcentaje de remoción DQO mostrados en la Tabla 22.

Tabla 22. Tabla resumen para el porcentaje de remoción de la DQO variando microorganismo (16 y 19) y pretratamiento.

ENSAYO 1 ESTERILIZADA		
CEPA	Δ DQO	%REM
16	9501.29	81.98
19	6361.74	87.33
ENSAYO 2 SIN ESTERILIZAR		
CEPA	Δ DQO	%REM
16	5149.98	72.69
19	5948.64	80.14

De la Tabla 22 se puede observar que el microorganismo 19 siempre cumple con el requerimiento de superar el 80% de remoción, además, en la primera etapa del proceso esta muestra mayor porcentaje de degradación.

En la mayoría de los casos un mayor crecimiento de biomasa representa mayor capacidad de degradación, como se observa en la Gráfica 7 el aislamiento 19 tiene mayor crecimiento de biomasa que el aislamiento 16; esto depende del metabolismo de cada microorganismo y de la relación que existe entre el crecimiento celular y la ruta metabólica por la cual el microorganismo degrada los contaminantes.

Analizando las medias de la Tabla 21 se muestra que la media de las degradaciones para el aislamiento 19 mayor que para el aislamiento 16, lo que explica que la remoción es mayor en el primer microorganismo y por esto se seleccionó para su estudio.

5.5.2 Efecto del tipo de pretratamiento sobre el tratamiento de biodegradación

Igualmente, en esta etapa del proceso se pretendió corroborar la posibilidad de iniciar el tratamiento de biodegradación con agua residual sin esterilizar (ensayo 2) y de esta manera implementar un proceso más económico, evitando la esterilización por temperatura y presión dentro de la empresa.

Tabla 23. ANOVA para la disminución en la DQO por tipo de Pretratamiento.

Fuente	Sumas de cuad.	GI	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	2.03E+02	1	2.03E+02	1.87	0.2017
Intra grupos	1.09E+03	10	1.09E+02		
Total (Corr.)	1.29E+03	11			

Puesto que en el análisis de varianza, Tabla 23, el P-valor es superior o igual a 0.05 (P-valor 0.2017), no hay diferencia estadística significativa entre las medias del porcentaje de remoción de la DQO de un pretratamiento a otro, esto demuestra la validez de la hipótesis nula, es decir, se acepta la afirmación de que no existe una influencia del factor de tipo de pretratamiento sobre el porcentaje de remoción en la DQO.

Tabla 24. Test de Rangos Múltiples para la disminución en la DQO por tipo de Pretratamiento

PRETRATAMIENTO	FRECUENCIA	MEDIA	GRUPOS HOMOGENEOS
E1	6	76.4183	X
E2	6	84.6533	X

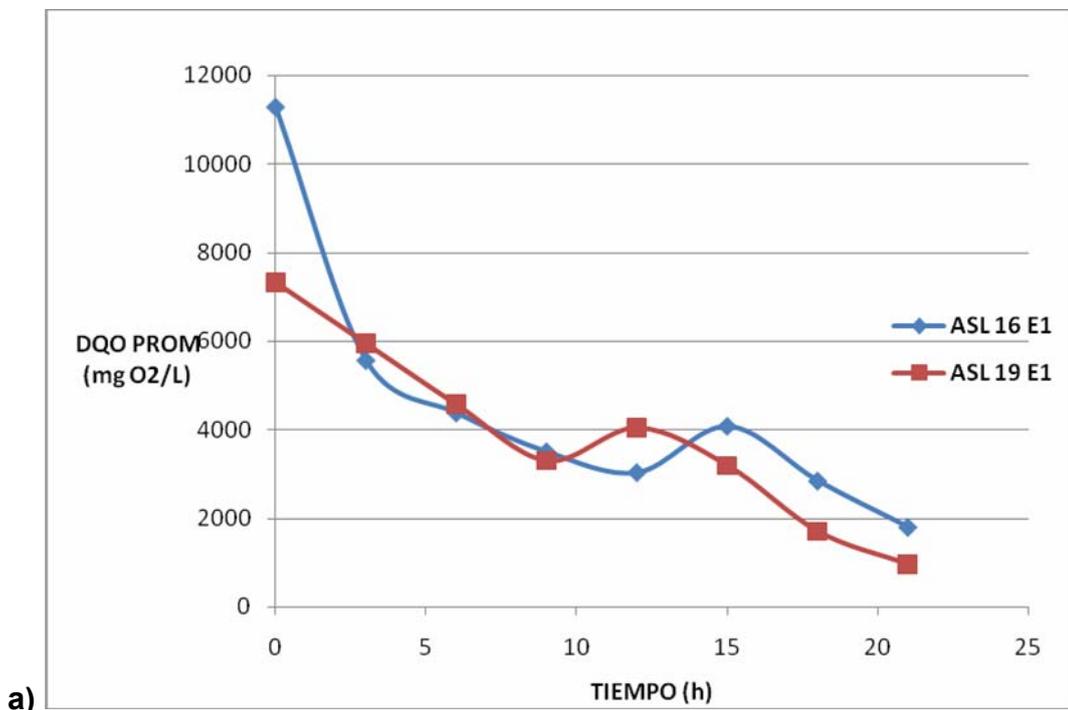
E1: Esterilizado E2: Sin esterilizar

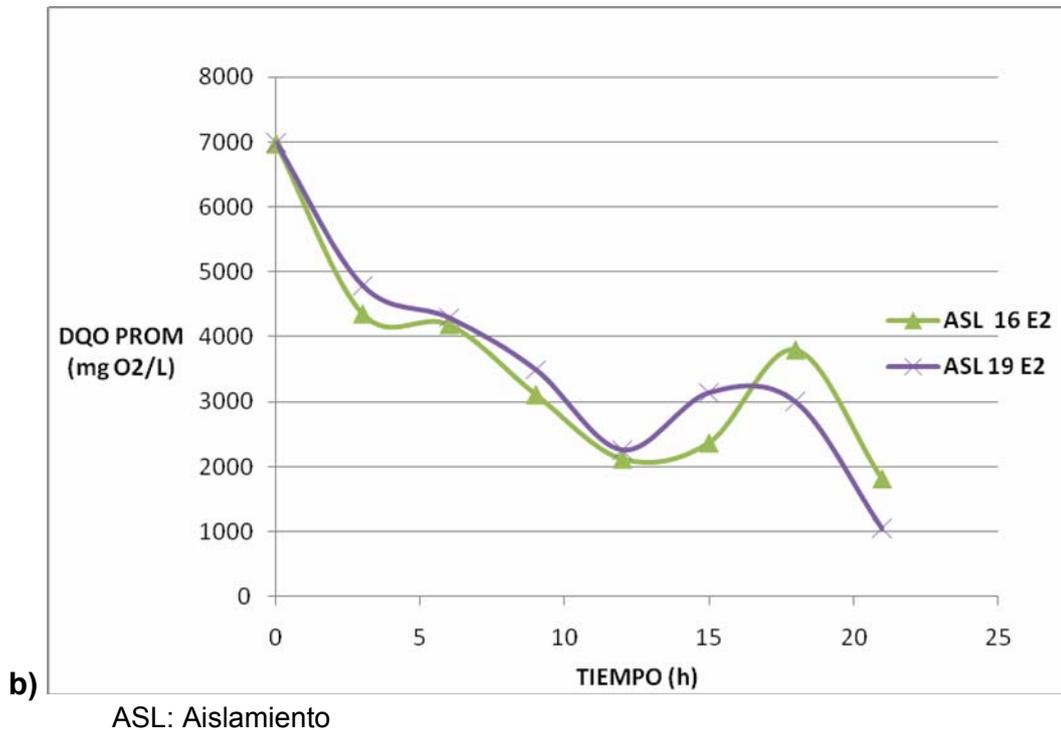
En el test de rangos múltiples, Tabla 24, se muestra que hay un solo grupo homogéneo, corroborando así que no hay diferencias estadísticas entre el tipo de pretratamiento a utilizar.

Se comprueba así que no existe inconveniente para iniciar el proceso de biodegradación con agua sin esterilizar, esto implica una gran ventaja en el proceso ya que se incurre en menos costos de operación.

La Gráfica 5 a) y b) muestra el comportamiento de la demanda química de oxígeno para los aislamientos 16 y 19 en los dos pretratamientos, se observa que las tendencias de la degradación son muy similares pero el microorganismo 19 muestra valores finales para la DQO inferiores a los del microorganismo 16, la mejor degradación para este ensayo se obtiene con el aislamiento 19 iniciando el proceso con agua esterilizada y sin esterilizar (Ensayo 1 y 2 respectivamente)

Gráfica 5. DQO vs Tiempo para aislamientos 16 y 19 en los dos pretratamientos. a) Aislamientos 16 y 19 en ensayo 1, b) Aislamientos 16 y 19 en ensayo 2





5.6 EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA Y DE LA VELOCIDAD DE AGITACIÓN SOBRE EL TRATAMIENTO DE BIODEGRADACIÓN Y EL CRECIMIENTO CELULAR.

5.6.1 Efecto de la concentración de glucosa sobre el tratamiento de biodegradación

Con el aislamiento 19, escogido como el microorganismo con el cual se llevó a cabo el proceso de biodegradación final, se prosigue a realizar un diseño de experimentos que permitiera conocer la concentración de glucosa necesaria para obtener el mejor porcentaje de remoción de DQO, además, de conocer la cantidad necesaria requerida para calcular los costos de materia prima.

Tabla 25. ANOVA para Porcentaje de Remoción en la DQO por Concentración de Glucosa.

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	1564.4	2	782.202	20.18	0.00
Intra grupos	930.426	24	38.7678		
Total (Corr.)	2494.83	26			

Puesto que en el análisis de varianza, Tabla 25, el P-valor es menor a 0.05 (P-valor 0.00), sí hay diferencia estadística significativa entre las medias del porcentaje de remoción de la DQO de un nivel de concentración de glucosa a otro, esto demuestra la invalidez de la hipótesis nula, es decir, se acepta la afirmación de que sí existe una influencia del factor de la concentración de glucosa sobre el porcentaje de remoción en la DQO.

Tabla 26. Test de Rangos Múltiples para Porcentaje de Remoción en la DQO por Concentración de Glucosa.

[] GLUCOSA	FRECUENCIA	MEDIA	GRUPOS HOMOGENEOS
10	9	75.67	X
1	9	89.5867	X
3	9	93.3744	X

Para el caso del test de rangos múltiples, Tabla 26, se demuestra que hay dos grupos homogéneos y que hay diferencias estadísticas entre las concentraciones de glucosa a utilizar, siendo 10 g/L la concentración con qué se obtuvo menor remoción media de DQO y, a pesar de que 1 y 3 g/L de glucosa están en mismo grupo de homogeneidad, 3 g/L presenta mejores resultados (mayor media), además ofrece un margen de seguridad en el proceso.

Con el fin de fijar la concentración de glucosa para emplear en la degradación se analizaron los resultados obtenidos para la reducción total de la DQO y el porcentaje total de remoción mostrados en la Tabla 27.

Tabla 27. Tabla resumen para el porcentaje de remoción en la DQO variando concentración de glucosa y velocidad de agitación.

1 g/L GLUCOSA		
RPM	Δ DQO	%REM
100	7490.88	92.85
150	5149.98	88.62
200	6692.22	87.29
3 g/L GLUCOSA		
RPM	Δ DQO	%REM
100	9363.59	94.41
150	10272.41	94.34
200	7766.28	91.38
10 g/L GLUCOSA		
RPM	Δ DQO	%REM
100	8509.86	67.83
150	15642.71	82.92
200	11649.41	76.27

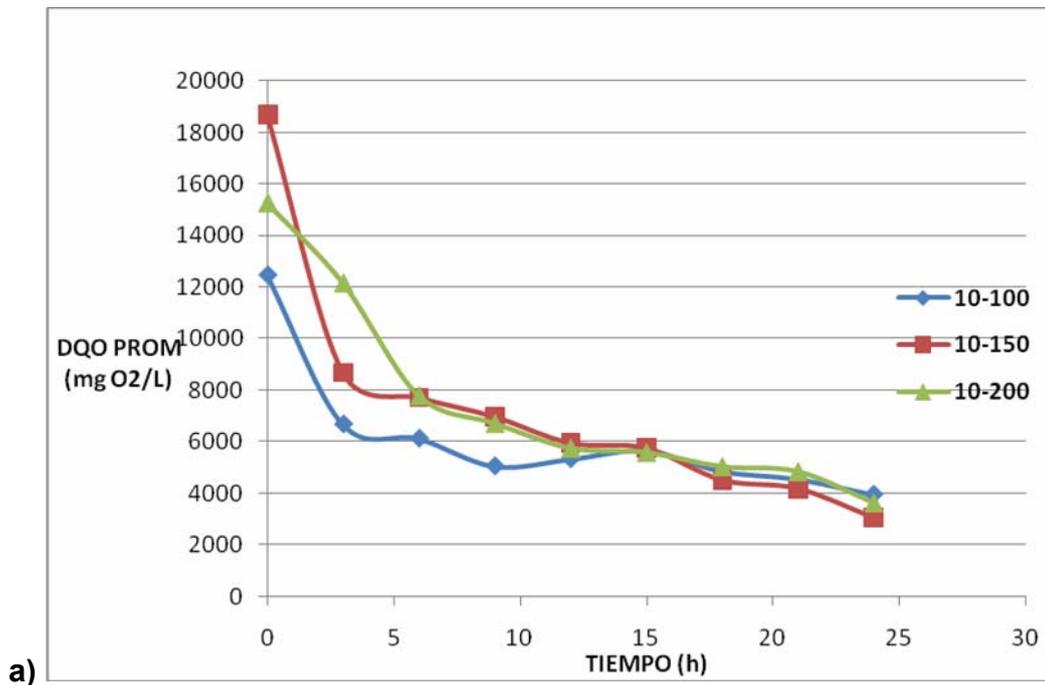
De la Tabla 27 se puede observar que a cualquier velocidad de agitación, la concentración de 3 g/l siempre supera el 90% en el porcentaje de remoción, lo que implica un proceso más eficiente.

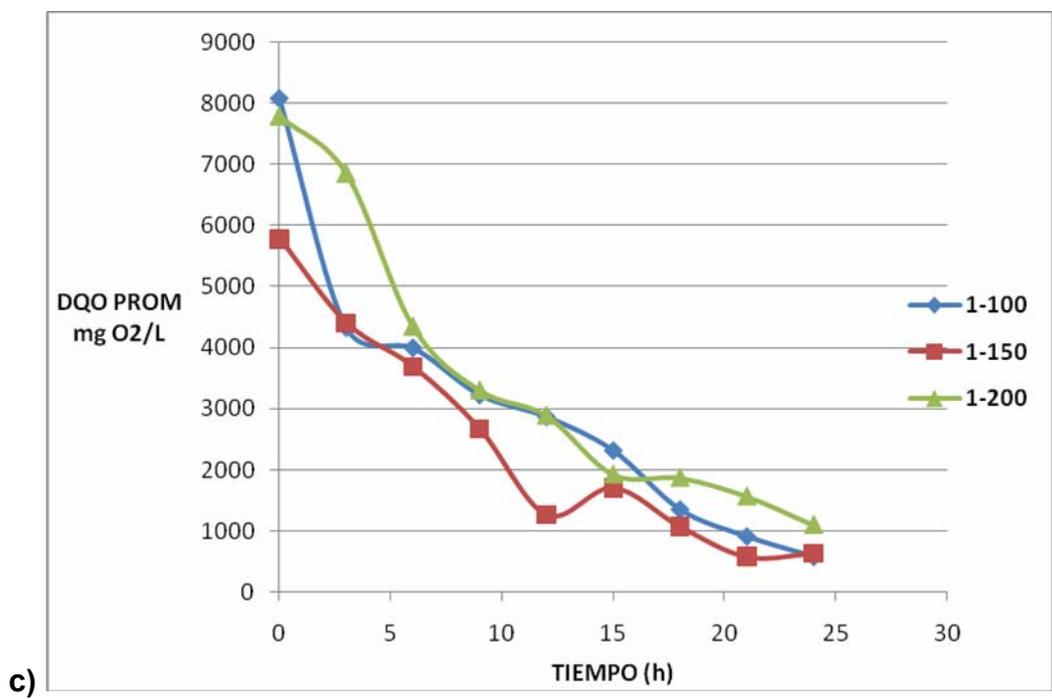
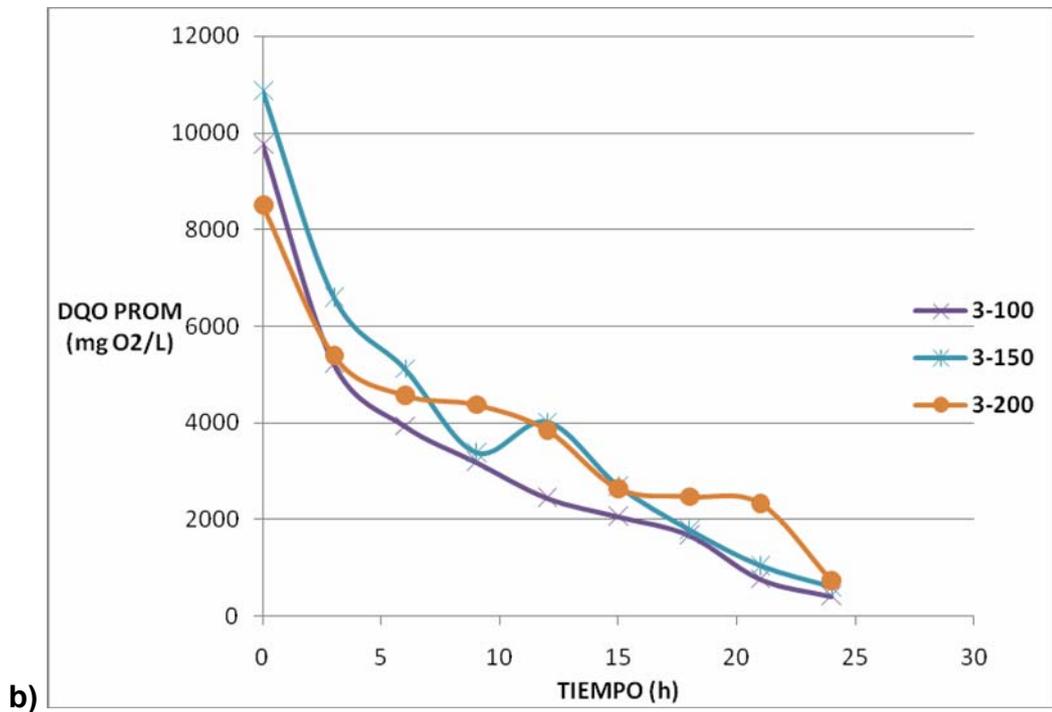
Analizando la media de los datos arrojados en la Tabla 26, se muestra que la media de los porcentajes de degradación para la concentración de 3 g/L es mayor (93.37%) que para las demás concentraciones, además los deltas de la DQO para esta concentración se encuentran por encima de los deltas de la DQO presentados por la concentración de 1 g/L, lo que explica que la remoción es mayor en este tratamiento (3 g/L) y se seleccionó para su estudio.

La Gráfica 6. a) muestra el comportamiento de la degradación en la DQO para el aislamiento 19 con una concentración de glucosa de 10 g/L, como se observa, las tendencias de la degradación en este ensayo son similares para todas las velocidades de agitación, en este caso es necesario basarse en el análisis estadístico y en la conveniencia de costos de operación del proyecto, para conocer la mejor alternativa de elección.

Se puede ver una diferencia entre las cinéticas de degradación para las velocidades de agitación de 100 rpm y 200 rpm, ya que la primera presenta menores valores en la DQO para todos los periodos de tiempo

Gráfica 6. DQO vs Tiempo. Estudio efecto concentración de glucosa y velocidad de agitación, a) 10 g/L glucosa, b) 3 g/L glucosa, c) 3 g/L glucosa, con las tres velocidades de agitación.





Un comportamiento similar se obtuvo para la Gráfica 6. b) y c) que muestran el comportamiento de la degradación en la DQO para el aislamiento 19 a una

concentración de glucosa de 3 g/L y 1 g/L respectivamente, como se observa las remociones en la degradación de estos ensayos son mejores para la velocidad de agitación de 100 rpm.

5.6.2 Efecto de la concentración de glucosa sobre la concentración de proteína celular

Para el aislamiento 19, seleccionada como el microorganismo con el cual se llevó a cabo el proceso de biodegradación final, también se cuantificó la concentración de proteína celular asociada al crecimiento (indicador) y se evaluó el efecto de la concentración de glucosa sobre la producción de biomasa.

Tabla 28. ANOVA para Concentración de Proteína Celular por Concentración de Glucosa.

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	0.319983	2	0.159992	6.04	0.0037
Intra grupos	2.06716	78	0.0265021		
Total (Corr.)	2.38715	80			

Puesto que en el análisis de varianza, Tabla 28, el P-valor es menor a 0.05 (P-valor 0.0037), sí hay diferencia estadística significativa entre las medias la concentración de proteína celular de un nivel de concentración de glucosa a otro, esto demuestra la invalidez de la hipótesis nula, es decir, se acepta la hipótesis alterna de que sí existe una influencia del factor de la concentración de glucosa sobre la concentración de proteína celular.

Tabla 29. Test de Rangos Múltiples para Concentración de Proteína Celular por Concentración de Glucosa.

[]GLUCOSA	FRECUENCIA	MEDIA	GRUPOS HOMOGENEOS
1	27	0.30869	X
3	27	0.400633	X
10	27	0.461604	X

Para el caso del test de rangos múltiples, Tabla 29, se demuestra que hay dos grupos homogéneos y que hay diferencias estadísticas entre las concentraciones de glucosa a utilizar, encontrándose que 3 y 10 g/L conforman un grupo de homogeneidad y 1 g/L ocupa otro.

Del análisis realizado para la cinética de degradación se seleccionó la concentración de glucosa de 3 g/L, Tabla 29, corroborada en este análisis como una alternativa muy válida ya que no presenta diferencia estadística frente a la concentración de 10 g/L que presenta la mayor media de concentración de proteína celular.

Se puede observar, además, una relación inversa entre la degradación de la DQO y la concentración de proteína celular (crecimiento celular); esto se puede explicar ya que a menores concentraciones de glucosa se limitan las condiciones de crecimiento y el microorganismo debe consumir las fuentes de carbono alternas (contaminantes).

Observando las medias de la Tabla 29, se muestra que la media de la concentración de proteína para la concentración de 3 g/l se encuentran dentro del grupo homogéneo de la concentración de 10 g/L, lo que explica su elección como alternativa menos costosa y eficiente.

5.6.3 Efecto de la velocidad de agitación sobre el tratamiento de biodegradación

La velocidad de agitación es otro factor determinante en el proceso de biodegradación para esta investigación y para la implementación dentro de la empresa, es por esto que se realizó un diseño de experimentos que permitiera conocer la velocidad de agitación necesaria para obtener el mejor porcentaje de remoción de DQO.

Tabla 30. ANOVA para Porcentaje de Remoción en la DQO por Velocidad de Agitación.

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	78.6854	2	39.3427	0.39	0.6807
Intra grupos	2416.15	24	100.673		
Total (Corr.)	2494.83	26			

Puesto que en el análisis de varianza, Tabla 30, el P-valor es mayor o igual a 0.05 (P-valor 0.6807), no hay diferencia estadística significativa entre las medias del porcentaje de remoción de la DQO de un nivel de velocidad de agitación a otro, esto demuestra la validez de la hipótesis nula, es decir, se acepta la afirmación de que no existe una influencia de la velocidad de agitación sobre el porcentaje de remoción en la DQO.

Tabla 31. Test de Rangos Múltiples para Porcentaje de Remoción en la Demanda Química de Oxígeno por Velocidad de Agitación

AGITACION	FRECUENCIA	MEDIA	GRUPOS HOMOGENEOS
200	9	84.9789	X
100	9	85.0278	X
150	9	88.6244	X

En el caso del test de rangos múltiples, Tabla 31, muestra que hay un solo grupo homogéneo, corroborando así que no hay diferencias estadísticas entre la velocidad de agitación a utilizar, esto se puede deber a que todas las velocidades de agitación pueden suministrar el oxígeno disuelto necesario para el metabolismo del microorganismo.

Los valores de las medias de la degradación por velocidad de agitación se encuentran muy cercanas, Tabla 31, siendo 150 rpm la velocidad con mayor media, aunque tiene una diferencia de solo 3.6% de remoción media en la DQO con la velocidad de agitación de 100 rpm, la cual es menos costosa para tanques agitados a la hora de implementación en una planta, de esta manera se elige 100 rpm como la velocidad de agitación en el proceso de biodegradación.

5.6.4 Efecto de la velocidad de agitación sobre la concentración de proteína celular

La velocidad de agitación es otro factor determinante en el crecimiento celular y en el proceso de biodegradación para esta investigación y para la implementación dentro de la empresa, es por esto en el diseño de experimentos se evaluó el efecto de la velocidad de agitación sobre crecimiento celular y porcentaje de remoción en la DQO.

Tabla 32. ANOVA para Concentración de Proteína Celular por Velocidad de Agitación.

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	1.32741	2	0.663705	48.85	0
Intra grupos	1.05974	78	0.0135864		
Total (Corr.)	2.38715	80			

Puesto que en el análisis de varianza, Tabla 32, el P-valor es menor a 0.05 (P-valor 0.00), sí hay diferencia estadística significativa entre las medias de la concentración de proteína celular de un nivel de velocidad de agitación a otro, esto demuestra la invalidez de la hipótesis nula, es decir, se acepta la hipótesis alterna de que sí existe una influencia del factor de velocidad de agitación sobre la concentración de proteína celular.

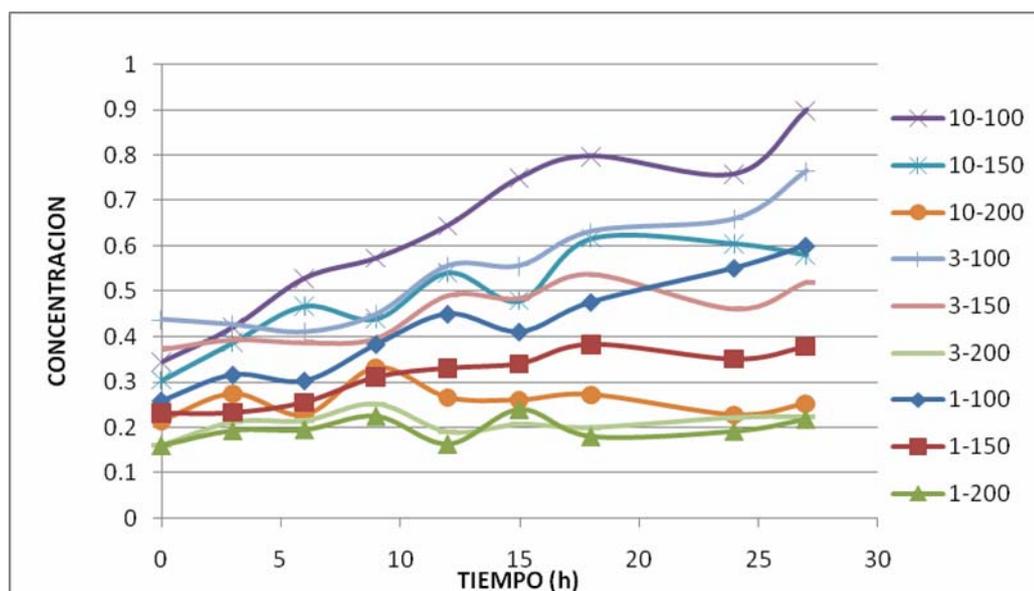
Tabla 33. Test de Rangos Múltiples para Concentración de Proteína Celular por Velocidad de Agitación

VEL. AGITACION	FRECUENCIA	MEDIA	GRUPOS HOMOGENEOS
200	27	0.221545	X
150	27	0.417941	X
100	27	0.531442	X

En el caso del test de rangos múltiples, Tabla 33, se muestra que hay tres grupos, corroborando que sí hay diferencias estadísticas entre la velocidad de agitación a utilizar para la variable de respuesta concentración de proteína celular

Los valores de las medias de la concentración de proteína celular por velocidad de agitación se encuentran diferenciadas siendo 100 rpm la velocidad con mayor media, la cual es menos costosa a la hora de implementación en una planta, de esta manera se corrobora que 100 rpm es la mejor velocidad de agitación para el proceso de biodegradación.

Gráfica 7. Concentración proteína celular vs Tiempo para las concentraciones de glucosa y la velocidad de agitación



La Gráfica 7 muestra el comportamiento de la concentración de proteína celular para el aislamiento 19 a diferentes concentraciones de glucosa y velocidades de agitación, como se observa las tendencias del crecimiento celular en este ensayo se diferencian sobre todo en los puntos finales, donde la concentración de glucosa de 10 g/L agitada a 100 rpm presenta el mayor crecimiento mientras que el ensayo llevado a cabo con 1 g/L agitado a 200 rpm presenta la menor concentración, ya que la concentración de 1 g/L es una concentración limitante para el crecimiento celular.

Igualmente se logra apreciar que los ensayos llevados a cabo a 200 rpm tienen menor crecimiento mientras que los efectuados a 100 rpm tienen mayor concentración de proteína celular, permitiendo entender que a velocidades de agitación mayores, menor es el crecimiento de biomasa.

5.7 EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE PEPTONA SOBRE EL TRATAMIENTO DE BIODEGRADACIÓN Y EL CRECIMIENTO CELULAR

5.7.1 Efecto de la concentración de peptona sobre el tratamiento de biodegradación

Conociendo el microorganismo a utilizar (aislamiento 19), el tipo de pretratamiento (sin esterilizar), la concentración de glucosa (3 g/L) y la velocidad de agitación (100 rpm) para el proceso de biodegradación, se requiere, por último, conocer la concentración de peptona que conserve la eficiencia de remoción de la DQO, de esta forma se prosigue a realizar un diseño de experimentos que permita conocer la concentración de peptona necesaria para obtener el mejor porcentaje de remoción de DQO, además, conocer la cantidad necesaria requerida para conocer los costos de materia prima.

Tabla 34. ANOVA para Porcentaje de Remoción en la DQO por Concentración de Peptona.

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	133.901	2	66.9507	1.61	0.28
Intra grupos	250.021	6	41.6702		
Total (Corr.)	383.923	8			

Puesto que en el análisis de varianza, Tabla 34, el P-valor es mayor o igual a 0.05 (P-valor 0.28), no hay diferencia estadística significativa entre las medias del porcentaje de remoción de la DQO de un nivel de concentración de peptona a otro, esto demuestra la validez de la hipótesis nula, es decir, se acepta la afirmación de que no existe una influencia del factor de concentración de peptona sobre el porcentaje de remoción en la DQO.

Tabla 35. Test de Rangos Múltiples para Porcentaje de Remoción en la DQO por Concentración de Peptona.

[] PEPTONA	FRECUENCIA	MEDIA	GRUPOS HOMOGENEOS
0.5	3	85.54	X
1.5	3	92.7933	X
2.5	3	94.41	X

En el caso del test de rangos múltiples, Tabla 35, muestra que hay un solo grupo homogéneo, corroborando así que no hay diferencias estadísticas entre la velocidad de agitación a utilizar, para la remoción de DQO.

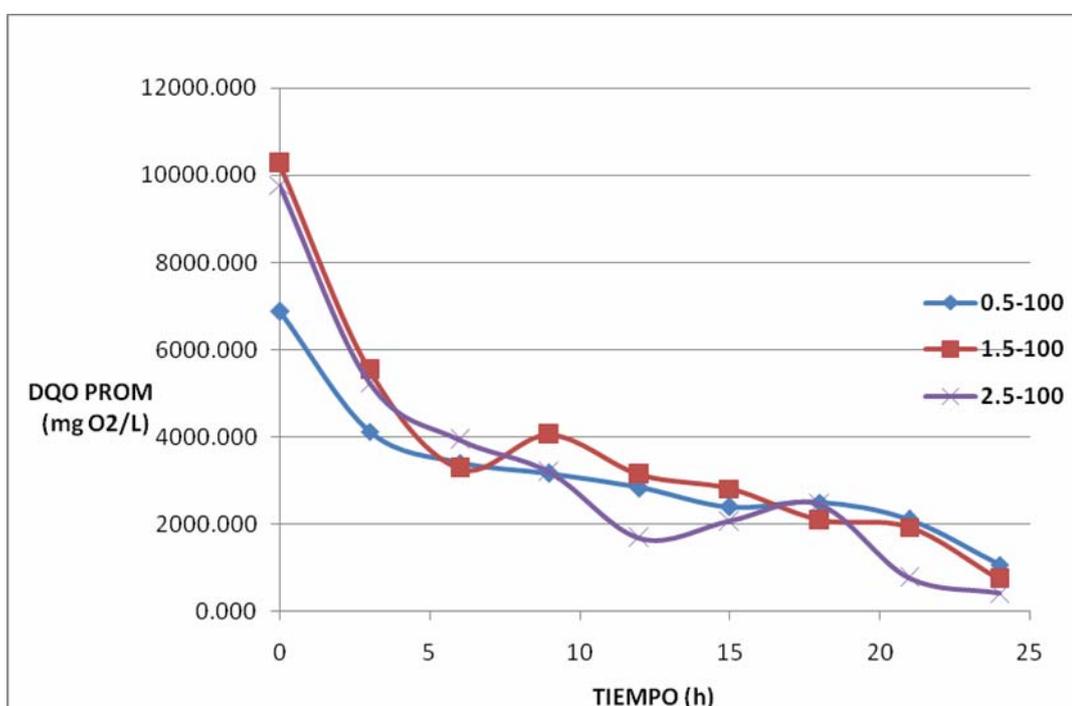
Para conocer la concentración de peptona para emplear en la degradación, se analizan los resultados obtenidos para la reducción total de la DQO y el porcentaje total de remoción, mostrado en la Tabla 36.

Tabla 36. Tabla resumen para el porcentaje de remoción de la DQO variando concentración de peptona.

[] PEPTONA	Δ DQO	%REM
2.5	9363.59	94.41
1.5	9528.83	92.80
0.5	5810.94	85.54

Analizando las medias de los datos arrojados en la Tabla 36 se puede observar que a la concentración de 2.5 g/l se obtiene una mayor remoción en la DQO, pero la concentración de 1.5 g/l no se aleja mucho del resultado de la anterior, se puede observar además que el delta de la DQO para la concentración de 0.5 g/L es aproximadamente la mitad que el delta obtenido para la concentración de 1.5 g/L, esta última se presenta como la alternativa más viable para su implementación ya que permite reducir los costos de materia prima.

Gráfica 8. DQO vs Tiempo para la concentración de Peptona



La Gráfica 8 muestra el comportamiento de la DQO para el aislamiento 19 a diferentes concentraciones de peptona, como se observa las tendencias de la degradación en este ensayo son similares para todas las concentraciones de peptona, en este caso es necesario basarse en el análisis estadístico y en la conveniencia de costos de operación del proyecto.

5.7.2 Efecto de la concentración de peptona sobre la concentración de proteína celular

Se requiere por último, conocer la concentración de peptona que conserve la eficiencia de remoción de la DQO y genere un buen crecimiento celular, de esta forma se prosigue a realizar el análisis del efecto de este factor sobre la concentración de proteína celular.

Tabla 37. ANOVA para Concentración de Proteína Celular por Concentración de Peptona.

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	0.286848	2	0.143424	15.98	0.00
Intra grupos	0.215403	24	0.00897513		
Total (Corr.)	0.502251	26			

Puesto que en el análisis de varianza, Tabla 37, el P-valor es menor a 0.05 (P-valor 0.00), sí hay diferencia estadística significativa entre las medias de la concentración de proteína celular de un nivel de concentración de peptona a otro, esto demuestra la invalidez de la hipótesis nula, es decir, se acepta la hipótesis alterna de que sí existe una influencia del factor de concentración de peptona sobre la concentración de proteína celular.

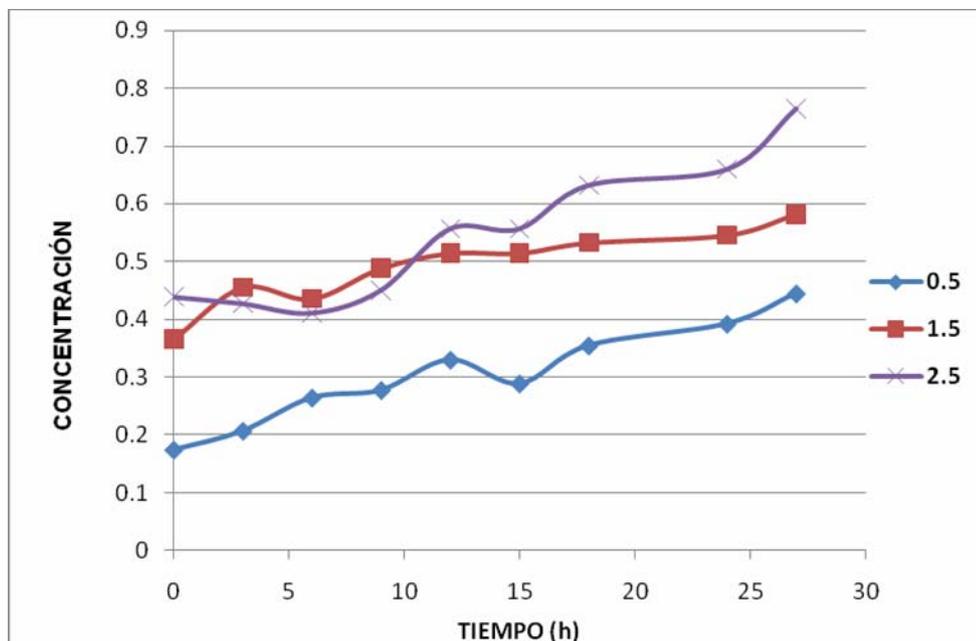
Tabla 38. Test de Rangos Múltiples para Concentración de Proteína Celular por Concentración de Peptona.

PEPTONA	FRECUENCIA	MEDIA	GRUPOS HOMOGENEOS
0.5	9	0.30365	X
1.5	9	0.491665	X
2.5	9	0.543588	X

En el caso del test de rangos múltiples, Tabla 38, se muestra que hay dos grupos homogéneos, corroborando así que sí hay diferencias estadísticas entre la concentración de peptona a utilizar, siendo 0.5 g/L un grupo con menor proteína celular y el otro grupo está conformado por 1.5 y 2.5 g/L de peptona.

Analizando las medias de la Tabla 38 se puede observar que a la concentración de 2.5 g/l se obtiene una mayor concentración de proteína celular, pero la concentración de peptona de 1.5 g/l se encuentra en el mismo grupo homogéneo de la anterior es por esto que se presenta como la alternativa más viable para su implementación ya que se reducirían los costos de materia prima.

Gráfica 9. Concentración de Proteína Celular vs tiempo para las concentraciones de peptona



La Gráfica 9 muestra el comportamiento de la concentración de proteína celular para el microorganismo 19 a diferentes concentraciones de peptona,

como se observa las tendencias del crecimiento celular en este ensayo se comportan de manera similar a los ensayos realizados para la concentración de glucosa donde a mayor es la concentración del cosustrato mayor es el crecimiento de biomasa, de igual manera es necesario apoyarse en la elección tomada a partir del análisis estadístico y de costos.

La concentración de proteína para 0.5 g/L de peptona se encuentran por debajo de los valores de proteína para las otras dos concentraciones de peptona (1.5 y 2.5 g/L), este método además comprueba que el método indirecto de determinación de crecimiento celular planteado presenta relación con los resultados esperados.

5.9 DECISIÓN FINAL

Según los diseños de experimentos, estas son las condiciones de operación recomendadas para el proceso de biodegradación: (Tabla 39)

Tabla 39. Condiciones finales del proceso de biodegradación

ETAPA	ESTUDIO	RESULTADO
1	<ul style="list-style-type: none"> Tratamiento con aislamientos 16, 18, 19 y 20 con agua residual esterilizada y sin esterilizar 	<ul style="list-style-type: none"> Someter a estudio el aislamiento 16 y el aislamiento 19 Corroborar el inicio del tratamiento con agua residual sin esterilizar
2	<ul style="list-style-type: none"> Tratamiento con aislamientos 16 y 19 con agua residual esterilizada y sin esterilizar 	<ul style="list-style-type: none"> Elección de la aislamiento 19 para implementar en el tratamiento. Iniciar el tratamiento con agua residual sin esterilizar
3	<ul style="list-style-type: none"> Tratamiento con aislamiento 19, agua residual sin esterilizar, con concentración de glucosa de 10, 3 y 1 g/L y con velocidad de agitación de 100, 150 y 200 rpm. 	<ul style="list-style-type: none"> Elección de concentración de glucosa igual a 3 g/L. Llevar a cabo tratamiento a 100 rpm.
4	<ul style="list-style-type: none"> Tratamiento con aislamiento 19, agua residual sin esterilizar, con concentración de glucosa de 3 g/L, velocidad de agitación de 100 rpm y concentración de peptona de 2.5, 1.5 y 0.5 g/L 	<ul style="list-style-type: none"> Elección de concentración de peptona igual a 1.5 g/L

Con base en los diseños de experimentos, la bibliografía consultada y las condiciones de operaciones más económicas, se decide la implementación de un proceso de biodegradación con el aislamiento 19, inoculado en agua sin esterilizar con una concentración de glucosa igual a 3 g/L, concentración de peptona de 1.5 g/L y agitada a 100 rpm.

Teniendo en cuenta estas condiciones de operación finales se obtiene un proceso de biodegradación con un delta en remoción de 9528.83 gr O₂/L y un porcentaje de remoción de 92.8%, el cual cumple con las condiciones impuestas por la legislación actual para el vertimiento de aguas residuales (remoción 80%) (Minambiente, 2006).

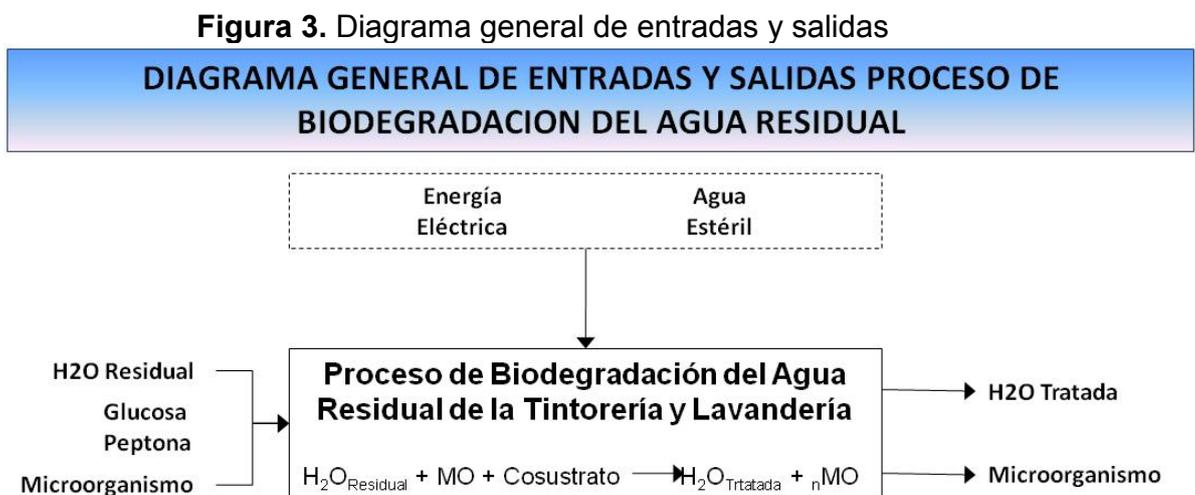
El aislamiento 19 fue identificado por métodos de microscopia y pruebas bioquímicas en la Sede de Investigaciones Universitarias de la Universidad de Antioquia (SIU), este fue identificado como *Rhodotorula rubra*. La hoja de resultados se encuentra en el Anexo V.

6. DISEÑO BASICO DE LA PLANTA DE TRATAMIENTO

6.1 DIAGRAMAS DE PROCESO

6.1.1 Diagrama general de entradas y salidas

Para la comprensión del proceso, se presenta a continuación el diagrama general de entradas y salidas (Figura 3) en el cual se establecen todas las materias primas utilizadas, *utilities* y la reacción que ocurre para poder lograr la biodegradación del agua residual del proceso de lavandería y tintorería.

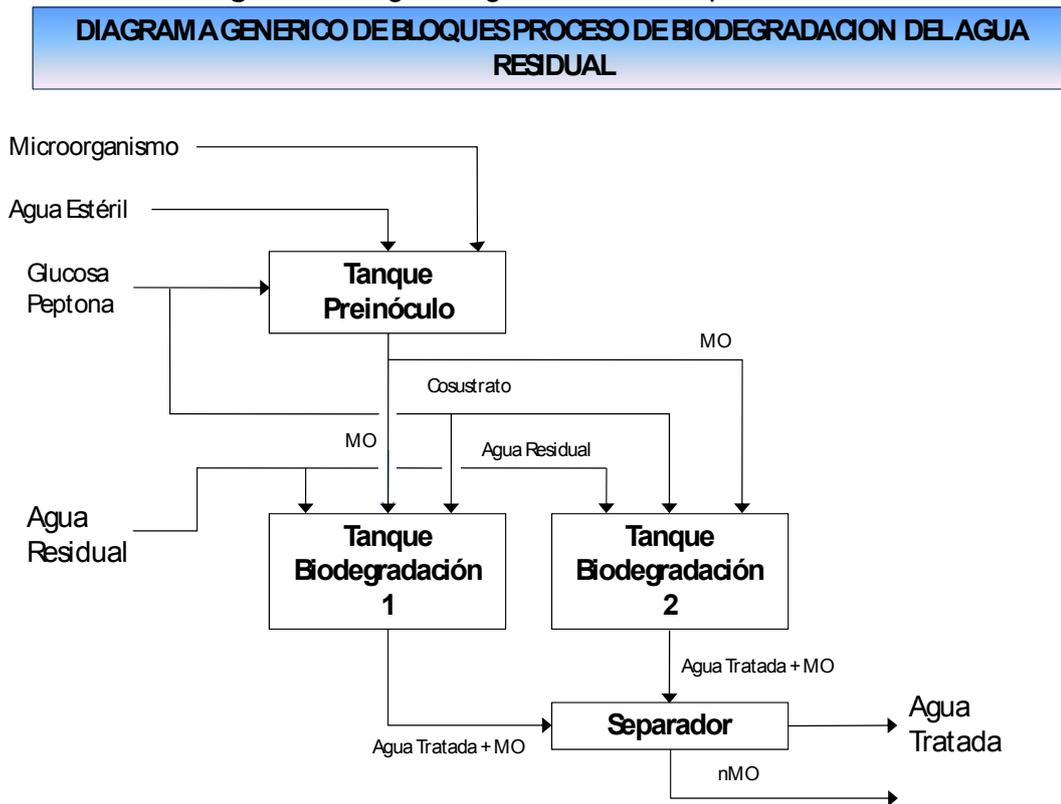


6.1.2 Diagrama genérico de bloques GBFD

En la Figura 4 se representa en bloques las etapas más importantes del proceso de biodegradación para la obtención de agua residual tratada.

El control ambiental se le realiza al agua de desecho proveniente de la etapa de producción de la planta (lavados y teñidos), con el objetivo de cumplir con las especificaciones establecidas en el Decreto No. 1594 del 26 de junio de 1984 (Minambiente, 2006).

Figura 4. Diagrama genérico de bloques GBFD



6.1.3 Diagrama de bloques de proceso BFD

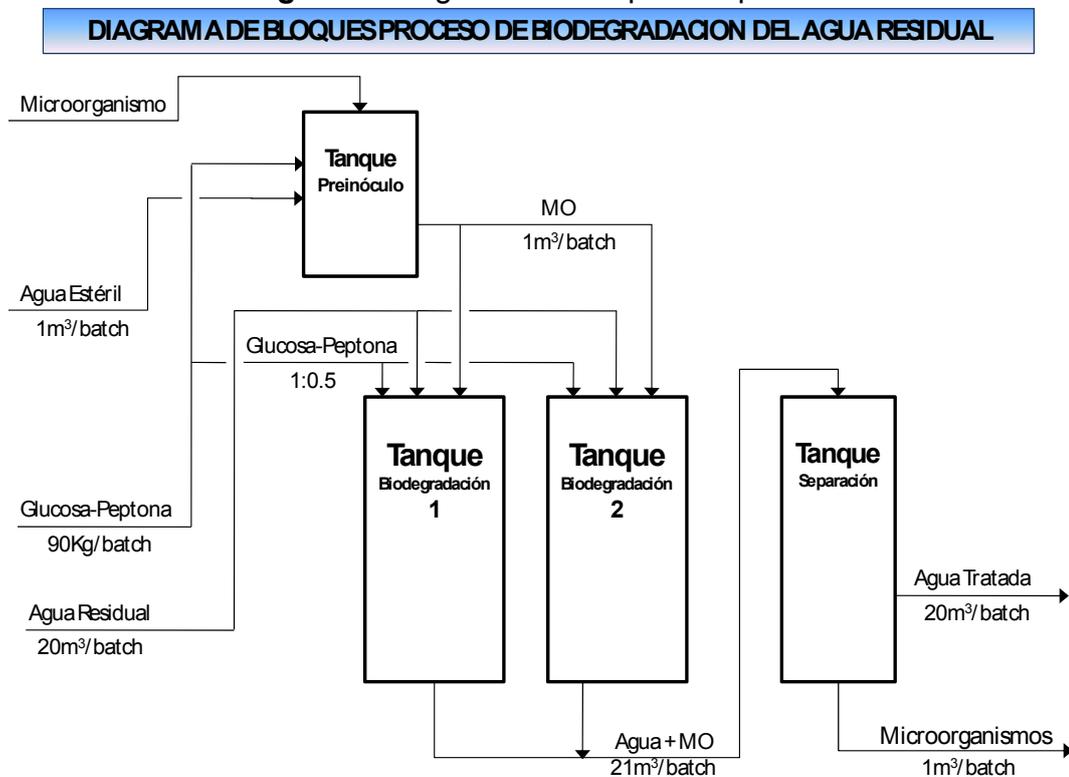
La Figura 5 muestra el diagrama de bloques para el proceso de biodegradación del agua residual del proceso de lavado y teñido.

De la Figura 5, se observa como el proceso de biodegradación del agua residual se divide en 3 bloques principales: la etapa de siembra del microorganismo en el tanque de preinóculo, donde se tiene el microorganismo en crecimiento en fresco, la etapa de biodegradación con

dos tanques batch y por último la etapa de separación donde se sedimentan las células.

Para el balance de masa se tomó la cantidad de microorganismos constante ya que dentro de los ensayos del laboratorio no se determinó una ecuación que determinara la cantidad total de crecimiento de biomasa, pero se tiene en cuenta que si hay crecimiento y que en la corriente de salida hay más cantidad de biomasa.

Figura 5. Diagrama de bloques de proceso



6.1.4 Diagrama de flujo preliminar del proceso PFD

El proceso se inicia con la preparación del microorganismo en el tanque agitado de preinóculo TK-101 mínimo 24 horas antes de iniciar procesos de biodegradación, en este tanque se mezclan las corrientes 2, que contiene la glucosa y la peptona necesaria para el crecimiento del microorganismo, con

la corriente 3 y 4 que contiene agua estéril y el microorganismo respectivamente.

La corriente 1 que contiene agua residual de la planta de acabados es bombeada con la bomba P-101 A/B en la corriente 5 hasta cualquiera de los tanques agitados de biodegradación disponible TK-102 o TK-103, estos son los encargados de llevar a cabo el proceso de biodegradación, el proceso es tipo batch con un ciclo de operación de 48 horas, es por esto que los dos tanques trabajan de manera separada cada uno con una carga suministrada con 24 horas de diferencia.

En esta etapa también se agrega el preinóculo bombeado por la bomba P-102 A/B en la corriente 6 y los 90 Kg de cosustrato de glucosa y peptona (1:0.5) en la corriente 2 para iniciar el proceso de biodegradación.

Luego de terminar el proceso de biodegradación, la mezcla de agua tratada más los microorganismos es bombeada por la bomba P-103 en la corriente 8 hasta el tanque TK-104 que se encarga de separar el agua del microorganismo, esto se facilita ya que este tanque no tiene agitación y se sedimentan las células, en la corriente 9 ubicada en el fondo del tanque sale el sedimento de células mientras que en la corriente 10 ubicada lateralmente se descarga el agua tratada. La tabla de corrientes, la tabla de los equipos y el PDF se presenta en el Anexo VI.

6.2 SELECCIÓN DE OPERACIONES UNITARIAS Y SELECCIÓN DE EQUIPOS

6.2.1 Bombas

Para el proceso planteado se utilizan tres bombas principalmente:

P-101 A/B: Transporta el agua residual que sale del proceso de lavado y teñido a los tanques de biodegradación, TK-102 y TK-103, para su tratamiento.

P-102 A/B: Lleva el microorganismo aislado desde el tanque de preinóculo TK-101 hasta los tanques de biodegradación TK-102 y TK-103.

P-103: Transporta el agua desde los tanques de biodegradación al tanque de separación para su posterior descarga.

El tipo de bombas elegidas son rotativas de etapa simple. Son ampliamente usadas en la industria y eficientes generando altas presiones para los flujos que manejan, las utilizadas en este proceso hacen parte del rango de operación de este tipo de bombas (170.3 KPa). Son mejores cuando trabajan con líquidos no viscosos como es el caso de este proceso (para todas las bombas. (Seider *et al.*, 1999)

6.2.2 Tanques

En el proceso de biodegradación planteado se emplean tres tanques agitados y unos sin agitación:

-TK-101: Se encarga de mantener el preinóculo para el proceso de biodegradación en los tanques posteriores, en este tanque se conserva el microorganismo aislado y fresco.

-TK-102 y TK-103: En estos se lleva a cabo el proceso de biodegradación, son agitados con el fin de garantizar las condiciones de crecimiento óptimas encontradas

-TK-104: Se encarga de separar las células del agua ya tratada, esto se logra por sedimentación de las células, es el único tanque sin agitación.

6.3 BALANCES DE MASA Y ENERGÍA

En el cálculo de los balances de masa y energía se empleó la ecuación general de conservación de masa y energía.

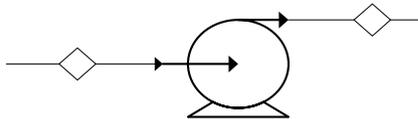
Generación + Entradas = Salidas + Acumulación

$$G + E = S + A \quad \text{Ecuación 4}$$

6.3.1 Balances de masa y energía para las bombas

La Figura 6 muestra el diagrama esquemático del flujo utilizado para el cálculo de los balances en una bomba, se muestran las suposiciones, aproximaciones y ecuaciones empleadas:

Figura 6. Flujo Esquemático para una bomba



Suposiciones y Aproximaciones:

- Líquido incompresible.
- Estado estacionario.
- Energía potencial despreciable

Balance de energía

$$W_T = \frac{1.67 * F * (P_2 - P_1)}{\varepsilon_{sh} * \varepsilon_{dr}}$$

Ecuación 5

F : Flujo volumétrico.

ϵ_{sh} : Eficiencia de la bomba.

ϵ_{dr} : Eficiencia del motor. (Turton,2003)

Para los cálculos de la potencia requerida por las bombas se estimó que el valor de ϵ_{sh} es de 65% para bombas rotatorias y el valor de ϵ_{dr} es de 85% para motores eléctricos, como lo indica la heurística (Turton *et al.*, 2003).

En la Tabla 40 se muestran los resultados de los requerimientos de energía para las bombas del proceso.

Tabla 40. Requerimientos energéticos para las bombas

Requerimiento	P-101 A/B	P-102 A/B	P-103 A/B
Potencia (KW)	0.05	0.005	0.05
ΔP (KPa)	120	120	120

6.3.2 Balances de masa y energía para los Tanques

Para el balance de masa y energía de los tanques se tuvieron dos suposiciones:

1. Como dentro de los ensayos de laboratorio no se determino la ecuación del crecimiento celular no se realizo el escalado para la cantidad total de biomasa generada por esto se toma como constante
2. El consumo de energía y requerimientos de equipos de agitación se tomo como el básico arrojado por el website [www. Matche.com](http://www.Match.com), ya que no se realizó el escalamiento ni diseño de los impellers.

6.4 DISEÑO DE EQUIPOS

Para el diseño de los equipos que se muestran a continuación, se emplearon correlaciones y ecuaciones que permitan el acercamiento al escalamiento de los resultados obtenidos a nivel laboratorio. Las hojas técnicas correspondientes a cada equipo con sus principales dimensiones se encuentran en el Anexo VII.

6.4.1 Tanques

Para el diseño de los tanques se emplea la heurística reportada en la literatura (Turton, 2003) y los requerimientos del proceso de biodegradación y capacidad requerida de tratamiento.

6.4.1.1 Diámetro: Para el cálculo del diámetro interno de los tanques usados en el proceso, se emplea la ecuación del volumen de un cilindro; la planta de acabados arroja diariamente 20m^3 , este volumen es igual para los tanques TK-102 y TK-103, el cual debe ser ajustado a 100 m^3 para mantener el volumen efectivo menor o igual al 20% del volumen total, lo que permite la aireación necesaria para el proceso.

Para el tanque de preinóculo TK-101, el volumen efectivo es de 2m^3 , el cual debe ser ajustado a 10m^3 para conservar las condiciones de aireación sin embargo esto no aplica para el tanque TK-104 donde no hay crecimiento, el ajuste que se debe realizar para este es aumentar 1.9m^3 al volumen final para el reboce como lo indica la heurística (Turton *et al.*, 2003).

También es necesario fijar la relación de la altura y el diámetro, se asume un valor intermedio de 3, donde la heurística reporta valores entre 2.5 y 5, de esta forma tenemos que el diámetro interno es igual a (Turton *et al.*, 2003):

$$D = \sqrt[3]{\frac{V}{12n}}$$

Ecuación 6.

Para conocer el diámetro externo del vessel es necesario sumar el espesor de la pared que se determina a continuación, los resultados se muestran en la Tabla 41.

6.4.1.2 Altura: La altura se puede hallar con la correlación L/D, teniendo el diámetro total encontrado con el volumen requerido de almacenamiento y asumiendo un valor intermedio de 3, donde la heurística reporta valores entre 2.5 y 5, de esta forma tenemos que la altura es tres veces el diámetro del vessel. Los resultados se encuentran en la Tabla 41.

6.4.1.3 Espesor de Pared: El espesor de la pared es un parámetro útil para poder saber que rigidez deben tener las paredes del cilindro, según la heurística para los vessel que tengan diámetros entre 1.07m y 1.52m, el espesor de la pared debe ser de 8.1 mm mientras que para contenedores que tengan un diámetro menor a 1.07 m el espesor de la pared debe ser de 6.4mm (Turton *et al.*, 2003).

6.4.1.4 Tiempo de Residencia: El tiempo de residencia es un parámetro ajustado, exigido por el proceso y por los requerimientos del tratamiento, este debe ser igual o superior a 48 horas en cada tratamiento o corrida para garantizar que la remoción de la Demanda Química de Oxígeno sea mayor al 80%.

La Tabla 41 muestra los resultados obtenidos para la altura, el diámetro, tiempo de residencia y espesor de pared para los vessel del proceso de biodegradación.

Tabla 41. Resultados obtenidos para la altura, diámetro, tiempo de residencia y espesor de pared de los Vessel

Tanque	Altura (m)	Diámetro Interno (m)	Diámetro Externo (m)	Espesor de Pared (mm)	Tiempo de Residencia (h)
TK-101	1.93	0.643	0.655	6.4	48
TK-102	4.15	1.384	1.4	8.1	48
TK-103	4.15	1.384	1.4	8.1	48
TK-104	2.5	0.834	0.847	6.4	48

Se puede concluir que los resultados de la altura, diámetro y espesor de pared se encuentran dentro de los parámetros de seguridad encontrados en la heurística (Turton *et al.*, 2003).

6.4.1.5 Material de construcción: Para la construcción de los tanques se emplea acero al carbón ya que las sustancias que se manejan en este proceso no ofrecen ambientes de corrosión muy elevados.

6.4.1.6 Disposición: Según la heurística para tanques que manejen volúmenes entre 3.8 m^3 y 38 m^3 se deben implementar tanques horizontales con soportes en concreto, para el tipo de proceso que se maneja, que requiere de agitación, los tanques horizontales no proveen uniformidad en la agitación, es por esto que se plantea que los vessel sean de tipo vertical con soportes en concreto que se emplean para tanques con capacidad de almacenamiento mayor a 38 m^3 (Turton *et al.*, 2003).

6.4.2 Bombas

Para el diseño de las bombas se emplea la heurística reportada en la literatura (Turton *et al.*, 2003) y los requerimientos del proceso de biodegradación y capacidad requerida de tratamiento.

6.4.2.1 Tipo de Bomba: El tipo de bomba requerido para los procesos de transporte dependen de la cantidad de caudal manejado en el proceso, las bombas que transportan el agua residual a los tanques de biodegradación y del tanque de separación hacia la descarga respectivamente, manejan 0.01389 m³/min, para este cantidad de caudal la heurística recomienda emplear bombas tipo rotatorias (Turton *et al.*, 2003).

Este tipo de bombas ofrece 15.200 metros de cabeza.

6.4.2.2 Material de Construcción: Para la construcción de las bombas se empleará acero al carbón ya que las sustancias que se manejan en este proceso no ofrecen ambientes de corrosión muy elevados.

7. ESTUDIO ECONÓMICO

7.1 INVERSIONES FIJAS

7.1.2 Construcciones y Obras Civiles

Para las adecuaciones de la planta de tratamiento es necesario realizar obras civiles para la estructura del soporte de los tanques.

7.1.3 Maquinaria y Equipo

La maquinaria requerida para el proceso son: tres tanques agitados, un tanque sedimentador, tres bombas y tuberías, los costos de compra para estos equipos se calcularon mediante la ayuda de www.matche.com y las características y funciones se presentan con profundidad en el diseño básico de la planta. Los resultados de los costos de inversión se muestran en la Tabla 42, junto con la depreciación de los activos fijos.

Tabla 42. Depreciaciones y Amortización de Diferidos

TABLA DE DEPRECIACION Y AMORTIZACION DE DIFERIDOS									
	VALOR	1	2	3	4	5	6	7	8
ACTIVOS FIJOS									
Obras civiles y construcciones	\$ 5,000,000.00	\$ 625,000.00	\$ 625,000.00	\$ 625,000.00	\$ 625,000.00	\$ 625,000.00	\$ 625,000.00	\$ 625,000.00	\$ 625,000.00
Maquinaria y equipo	\$42,679,662	\$ 5,334,957.75	\$ 5,334,957.75	\$ 5,334,957.75	\$ 5,334,957.75	\$ 5,334,957.75	\$ 5,334,957.75	\$ 5,334,957.75	\$ 5,334,957.75
Otros Depreciables	\$ 1,200,000.00	\$ 150,000.00	\$ 150,000.00	\$ 150,000.00	\$ 150,000.00	\$ 150,000.00	\$ 150,000.00	\$ 150,000.00	\$ 150,000.00
	Depreciacion	\$ 6,109,957.75							
ACTIVOS DIFERIDOS									
Estudios	\$ 0.00	\$ 0.00	\$ 0.00	\$ 0.00	\$ 0.00	\$ 0.00	\$ 0.00	\$ 0.00	\$ 0.00
Gastos de montaje	\$ 2,000,000.00	\$ 250,000.00	\$ 250,000.00	\$ 250,000.00	\$ 250,000.00	\$ 250,000.00	\$ 250,000.00	\$ 250,000.00	\$ 250,000.00
Gastos de puesta en marcha	\$ 1,500,000.00	\$ 187,500.00	\$ 187,500.00	\$ 187,500.00	\$ 187,500.00	\$ 187,500.00	\$ 187,500.00	\$ 187,500.00	\$ 187,500.00
Capacitación	\$ 1,200,000.00	\$ 150,000.00	\$ 150,000.00	\$ 150,000.00	\$ 150,000.00	\$ 150,000.00	\$ 150,000.00	\$ 150,000.00	\$ 150,000.00
Otros	\$ 940,000.00	\$ 117,500.00	\$ 117,500.00	\$ 117,500.00	\$ 117,500.00	\$ 117,500.00	\$ 117,500.00	\$ 117,500.00	\$ 117,500.00
	Amortizacion	\$ 705,000.00							

Se puede observar que los costos de capital para la compra de equipos corresponde a \$42.679.662 y los costos por razón de materias primas mas operación son de \$27.673.606, los cuales tiene una relación de 0.65 (Operación/Capital), donde los costos de capital son 65% más representativos que los costos de operación.

7.2 INVERSIONES DIFERIDAS

7.2.1 Estudios

Los estudios preliminares del proyecto se realizaron en el laboratorio de biotecnología de la Universidad EAFIT; para la consecución de este proyecto de grado, los estudios adicionales que se necesiten realizar esta contemplados en el monto estimado para el capital de trabajo y sus proyecciones.

7.2.2 Gastos de Montaje y Puesta en Marcha

En el montaje y puesta en marcha de la planta de tratamiento se tiene un valor presupuestado de \$3.500.000 en total en el periodo cero como inversión inicial ya que si se tiene que incurrir en costos posteriores estos se tienen presupuestados en el capital de trabajo y sus proyecciones.

7.2.3 Capacitación

Para la capacitación de los empleados se tiene un presupuesto de \$1.200.000 ya que se pretende contratar personal calificado en procesos industriales, es decir, que este rubro se pretende destinar en capacitación de los procesos biotecnológicos y en capacitar a los empleados y administrativos en los procesos técnicos y tecnológicos con el fin de brindar

un buen funcionamiento y una buena fundamentación de los procesos, (Tabla 42).

7.2.4 Otros e Imprevistos

En los procesos de Organización, montaje y puesta en marcha de una planta tienden a surgir inconvenientes e imprevistos ya que es muy difícil poder encontrar una logística perfecta, por esto se planteó que el rubro para los imprevistos y otros sea del 20% de los rubros antes mencionados, los resultados de los costos de las inversiones diferidas se muestran en la Tabla 42.

7.3 CAPITAL DE TRABAJO

Para el capital de trabajo en efectivo y bancos, se tiene un presupuesto de \$5.000.000 con el fin de contar con la capacidad de solvencia económica de responder a pagos y deudas.

La Tabla 43 muestra la discriminación para los rubros del capital de trabajo; se tiene en cuenta la mano de obra ya que la empresa para poder cumplir con picos de demanda en el tratamiento tiene muy claro que tiene que tener reservas de capital para contratar personal temporal de apoyo.

Se realiza una proyección incremental del capital de trabajo que se desglosa en la Tabla 43 y se tiene en cuenta en el flujo de caja para cada periodo, y como lo dice la proyección es incremental y solo se trata de reponer o incrementar dicho capital en el aumento de la inflación (5%).

Tabla 43. Rubros Capital de Trabajo

CAPITAL DE TRABAJO	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Efectivo	\$ 1,000,000.00	\$ 1,050,000.00	\$ 1,102,500.00	\$ 1,157,625.00	\$ 1,215,506.25	\$ 1,276,281.56	\$ 1,340,095.64	\$ 1,407,100.42	\$ 1,477,455.44
Inventario materia prima	\$ 1,000,000.00	\$ 1,050,000.00	\$ 1,102,500.00	\$ 1,157,625.00	\$ 1,215,506.25	\$ 1,276,281.56	\$ 1,340,095.64	\$ 1,407,100.42	\$ 1,477,455.44
Mano de obra	\$ 500,000.00	\$ 525,000.00	\$ 551,250.00	\$ 578,812.50	\$ 607,753.13	\$ 638,140.78	\$ 670,047.82	\$ 703,550.21	\$ 738,727.72
Cartera	\$ 2,000,000.00	\$ 2,100,000.00	\$ 2,205,000.00	\$ 2,315,250.00	\$ 2,431,012.50	\$ 2,552,563.13	\$ 2,680,191.28	\$ 2,814,200.85	\$ 2,954,910.89
Otros	\$ 500,000.00	\$ 525,000.00	\$ 551,250.00	\$ 578,812.50	\$ 607,753.13	\$ 638,140.78	\$ 670,047.82	\$ 703,550.21	\$ 738,727.72
Total	\$ 5,000,000.00	\$ 5,250,001.00	\$ 5,512,502.00	\$ 5,788,128.00	\$ 6,077,535.25	\$ 6,381,412.81	\$ 6,700,484.20	\$ 7,035,509.11	\$ 7,387,285.22

7.4 COSTOS DE OPERACIÓN

7.4.1 Materia Prima

La materia prima de mayor importancia es el microorganismo seleccionado, que ya ha sido aislado en la etapa inicial de este proyecto.

Otra materia prima del proceso, aunque no representa un costo directo, es el agua descargada del proceso de producción de lavandería y tintorería que se clarifica y posteriormente pasa al proceso biológico.

En la Tabla 44 se muestra la discriminación de los rubros para el costo de operación, el costo de materia prima que se estimó sería igual al costo del cosustrato de glucosa y peptona, en el estudio de microorganismos y procesos en un laboratorio pueden utilizarse productos químicos puros para la obtención de medios de cultivo, pero en los procesos biotecnológicos industriales se utilizan frecuentemente, por motivos económicos, sustratos que en muchos casos son los subproductos de otras industrias aunque variados en su composición (Mateos, 2007).

Como fuente de carbono se emplean productos como melaza, extracto de malta y últimos avances emplean hidrolizados de celulosa, en el caso de fuentes de nitrógeno se emplean productos como gluten de maíz, extracto de levadura, extracto de carne, caseína, gelatina, semillas de maní, harina de

soya, semillas de algodón y girasol (Mateos, 2007). En el proyecto se pretende emplear como cosustratos melaza y harina de soya, sin embargo, deben hacerse los estudios pertinentes para verificar que el porcentaje de remoción de DQO se cumpla.

Tabla 44. Rubros Costo de Materia Prima

	Costo (\$/Kg)	Consumo (Kg)
Glucosa	348.361	21900
Peptona	887.169	10950

7.4.2 Mano de Obra Directa y Prestaciones

Para la mano de obra se pretende contratar un operario (Tabla 45) que se encargue completamente al proceso de tratamiento de aguas residuales con la supervisión del ingeniero de la planta, de igual forma al personal que tenga cualquier tipo de contacto con la planta o con el proceso como tal se pretende brindarles capacitación, rubro que se tiene contemplado en los activos diferidos.

Tabla 45. Personal, Sueldos y Prestaciones



7.4.3 Servicios, Mantenimiento, Seguros, Impuestos

Los datos para estimar los costos indirectos de servicios (\$1.500.000 mes), mantenimiento (\$800.000 anual), seguros (\$350.000 anual) fueron consultados en la empresa, lugar donde se pretende desarrollar el proyecto,

la discriminación de estos rubros se presentan en la Tabla 42 y para la proyección de los flujos se someten al incremento de la inflación.

7.5 INGRESOS

Los ingresos que se estiman para el proyecto se deben a los rubros que dejan de pagarse a la empresa prestadora de servicios públicos por agua para el proceso y alcantarillado, pues, el agua que se trate entrará a ser reutilizada en los procesos de lavado de prendas (acabados) de la planta en un 80%. El costo unitario de m³ de agua potable es de \$ 1020. Por tanto, los ingresos corresponden al ahorro en el consumo del agua de proceso multiplicado por el costo del metro cubico de agua.

Otro aporte importante para los ingresos del proyecto es el ahorro obtenido por el pago de la tasa retributiva en vertimientos de aguas residuales a cuerpos de agua, el valor de la tasa retributiva para el 2007 fue de 87.45 \$/Kg DQO, (Tabla 47). (Minambiente, 2006)

7.6 ESTIMACIÓN DE FLUJOS DE EFECTIVO

La Tabla 46 muestra el flujo de efectivo para el proyecto puro, es decir, los recursos de la inversión inicial son propios del proyecto, el análisis para el flujo de efectivo del inversionista o del proyecto con financiación se presenta en la evaluación financiera.

Los ingresos económicos (ahorro) para el primer año de trabajo son por \$10.943.394 año, con incremento en reutilización en el proceso del 5% anual, la Tabla 46 muestra las proyecciones para los ingresos económicos.

Los egresos económicos corresponden principalmente a los costos de la materia prima, costos de operación, impuestos, inversión en capital de trabajo, inversiones iniciales, entre otros que se discriminan en los flujos de caja netos.

Tabla 46. Flujo de Efectivo para Proyecto Puro

FLUJO DE CAJA DEL PROYECTO CON FINANCIACION									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
INGRESOS		\$38,617,000	\$40,547,850	\$42,575,243	\$44,704,005	\$46,939,205	\$49,286,165	\$51,750,473	\$54,337,997
Costos Operación		\$10,330,000	\$10,846,500	\$11,388,825	\$11,958,266	\$12,556,180	\$13,183,989	\$13,843,188	\$14,535,347
Costos Materia Prima		\$17,343,606	\$18,210,787	\$19,121,326	\$20,077,392	\$21,081,262	\$22,135,325	\$23,242,091	\$24,404,196
Depreciación		\$6,109,958	\$6,109,958	\$6,109,958	\$6,109,958	\$6,109,958	\$6,109,958	\$6,109,958	\$6,109,958
Amortización		\$705,000	\$705,000	\$705,000	\$705,000	\$705,000	\$705,000	\$705,000	\$705,000
Utilidad Operativa		\$4,128,436	\$4,675,605	\$5,250,134	\$5,853,388	\$6,486,806	\$7,151,894	\$7,850,236	\$8,583,496
Intereses		\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0
Utilidad antes de impuestos		\$4,128,436	\$4,675,605	\$5,250,134	\$5,853,388	\$6,486,806	\$7,151,894	\$7,850,236	\$8,583,496
Impuestos		\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0
Utilidad Operativa despues de impuestos		\$4,128,436	\$4,675,605	\$5,250,134	\$5,853,388	\$6,486,806	\$7,151,894	\$7,850,236	\$8,583,496
Préstamo	\$0								
Depreciación		\$6,109,958	\$6,109,958	\$6,109,958	\$6,109,958	\$6,109,958	\$6,109,958	\$6,109,958	\$6,109,958
Amortización		\$705,000	\$705,000	\$705,000	\$705,000	\$705,000	\$705,000	\$705,000	\$705,000
Amortización Capital		\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0
Inversion incremental en capital de trabajo		\$0	\$250,000	\$262,500	\$275,625	\$289,406	\$303,877	\$319,070	\$335,024
Inversión Inicial	\$51,179,662								
Capital de trabajo	\$5,000,000								
Total Inversion + Capital	\$56,179,662								
Flujo de Caja Neto	-\$56,179,662	\$10,943,394	\$11,240,563	\$11,802,591	\$12,392,721	\$13,012,357	\$13,662,975	\$14,346,124	\$15,063,430

7.7 EVALUACIÓN FINANCIERA

Como planteamiento para el análisis del flujo de efectivo del proyecto con financiación se tuvieron seis planteamientos donde el porcentaje de la deuda es del 0%, 30%, 40%, 50%, 60% y 100%, en la tabla se muestra los valores para K_o , suponiendo que la tasa de interés de préstamo de la entidad financiera sea del 19.56% (Banco de Occidente, 1.5% m.v. consulta: Diciembre 2007) y que la tasa de interés de oportunidad para el sector de servicios del sector textil es del 19.25%.

7.7.1 Indicadores de Rentabilidad

A continuación se presentan los flujos de efectivo, el VPN (Valor Presente Neto) y la TIR (Tasa Interna de Retorno) para los diferentes escenarios de planteamiento de la evaluación financiera.

Según los indicadores de Rentabilidad el proyecto desde el punto de vista lucrativo no es financieramente viable con un Valor Presente Neto de \$-38.598.851,66 y una Tasa Interna de Retorno de -13.8% menor que 19.25% que es la tasa de interés de oportunidad para el proyecto sin financiación pasando por un Valor Presente Neto de \$-8.824.394,7 una Tasa Interna de Retorno de 0.0% menor que 19.25% que es la tasa de interés de oportunidad, para el proyecto con financiación del 100%.

Cuando se plantea un proyecto de mejoramiento ambiental los indicadores económicos no se deben interpretar de igual manera que cuando se estudia la viabilidad de implementación de un proyecto que genere utilidad o que su objetivo final sea obtener un beneficio económico.

En el estudio de un proyecto de valor agregado el valor del presente neto debe ser mayor que cero y la tasa interna de retorno debe ser mayor que la tasa de oportunidad del sector donde se pretende implementar, en el caso de este proyecto donde el único objetivo es generar un bien al ambiente y la comunidad el valor presente neto debe ser analizado como un costo en el cual debe incurrir la empresa es por esto que se debe escoger la alternativa que presente un menor costo, es decir, un valor presente neto menos costoso, en cuanto a la tasa interna de retorno esta en lo posible debe ser mayor que cero (Coss, 1986).

7.7.2 Estudio de Sensibilidad

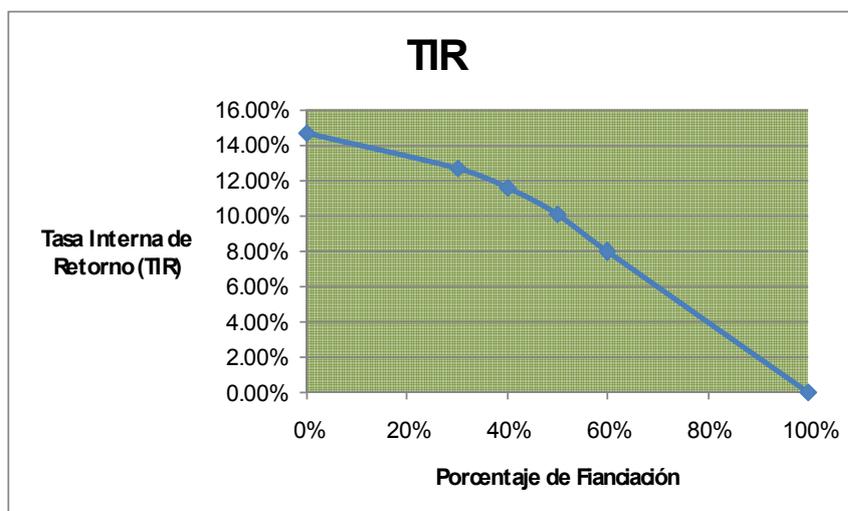
Para el análisis de la sensibilidad de los diferentes escenarios que se presentan según los porcentajes de financiación es conveniente generar una Tabla 47 resumen que nos permita conocer los factores más relevantes cuando se solicita un préstamo.

Tabla 47. Resumen Indicadores de Rentabilidad, Valor de las cuotas y el total de interés para los escenarios de Financiación

% Financiación	VPN(Ko')	TIR	Valor Cuota	Intereses
0%	-\$6,705,606.4	14.68%	\$0.0	\$0.0
30%	-\$4,938,322.3	12.68%	\$4,334,832.2	\$17,824,758.6
40%	-\$4,738,356.0	11.59%	\$5,779,776.2	\$23,766,344.8
50%	-\$4,758,863.3	10.10%	\$7,224,720.3	\$29,707,931.1
60%	-\$5,017,182.5	7.93%	\$8,669,664.3	\$35,649,517.3
100%	-\$8,824,394.7	0.00%	\$14,449,440.5	\$59,415,862.1

La Tabla 47 muestra como los valores del valor presente neto tienen tendencia a estabilizarse en un punto alrededor del 40% y la tasa interna de retorno disminuye su valor desde 14.68% para el proyecto sin financiación hasta 0% para el proyecto completamente financiado. (Gráfica 19)

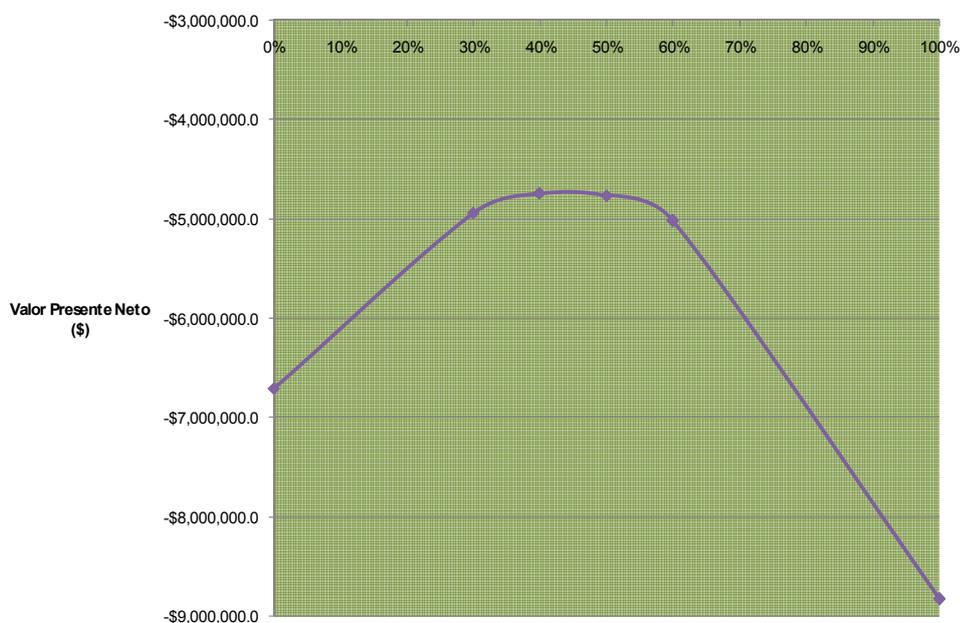
Gráfica 19. Comportamiento de la TIR frente a la Financiación



Dentro del análisis de sensibilidad planteado para los diferentes escenarios de financiación para el proyecto, mostrado en la Gráfica 10, se concluye que la mejor opción es contraer una financiación del 40% sobre la inversión inicial, ya que se presenta como punto máximo dentro del comportamiento del valor presente neto, esto indica el menor costo del proyecto.

Gráfica 10. Comportamiento del VPN frente a la Financiación

COMPORTAMIENTO DEL VPN RESPECTO AL % DE FINANCIACION



La financiación del 40% presenta un valor presente neto de \$-4.738.356,01, el menos costoso de los escenarios planteados, de igual forma la amortización de capital se encuentra dentro de los rangos de liquidez de empresa \$ 5.779.776,20.

Para este tipo de pago de deuda de cuota fija los intereses totales que se deben pagar a la entidad financiera son de \$23.766.344,84 correspondiente al 106% de la deuda inicial.

7.7.3 Riesgo

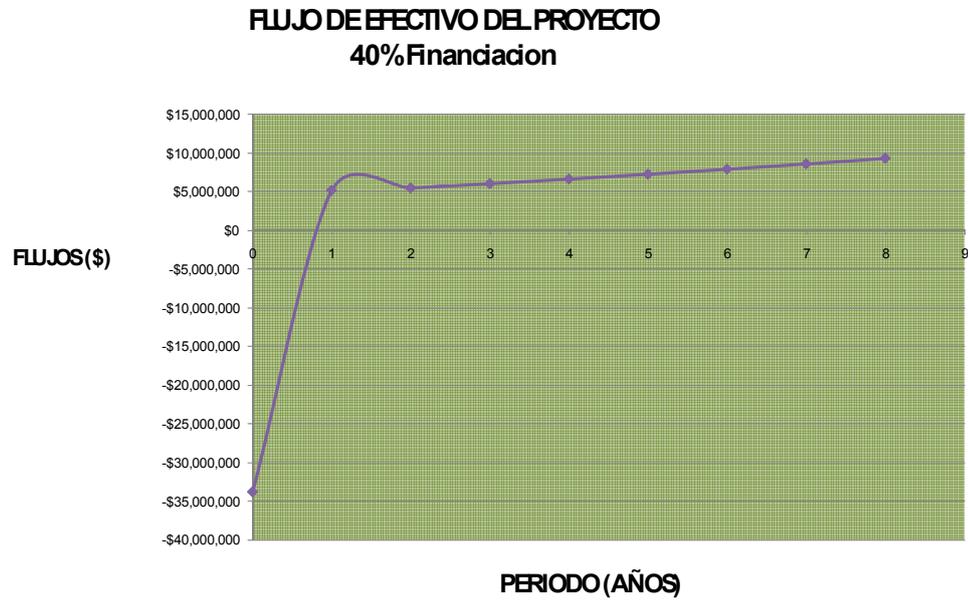
Como se puede apreciar en la Tabla 47, a medida que se aumenta el porcentaje de endeudamiento los valores de los intereses a pagar y la cuota a pagar a la entidad financiera aumentan de igual forma, de un monto de cuota e intereses igual a cero para el proyecto libre de deudas hasta un monto neto de \$59.415.862,1 en intereses y de \$14.449.440,5 en la cuota anual para el proyecto totalmente financiado.

Es necesario entrar a estudiar factores de riesgo como lo son las obligaciones financieras estas se pueden ver reflejadas en los valores arrojados por las tablas del pago de la deuda para los diferentes porcentajes de financiación, Anexo VIII.

No es descartable dentro de los negocios encontrar picos de demanda que favorezcan o perjudiquen los ingresos por eso no es conveniente contraer obligaciones financieras tan altas entonces es prudente encontrar un valor intermedio de financiación que nos permita cumplir con estas, estimando un valor promedio entre los valores presentes netos y la obligación financiera un valor conveniente sería una financiación del 40% (Coss, 1986).

Es rescatable anotar que los flujos de efectivo (Gráfica 11) se calcularon para el proyecto con tasa de interés de préstamo común del Banco de Occidente, podría ser de gran importancia encontrar otras entidades financieras que presten a menores tasas de interés o que tengan beneficios financieros para sectores determinados de la industria, además, es importante analizar las posibilidades de conseguir capital semilla de entidades que apoyen el emprendimiento y el surgimiento de nuevas alternativas de tratamiento y sobretodo que apoyen el compromiso con el ambiente.

Gráfica 11. Flujo de Efectivo para el proyecto Seleccionado



8. CONCLUSIONES

Se obtuvieron 20 aislamientos conformados por 18 bacterias y 2 levaduras, de los cuales solo 4 aislamientos (3 bacterias y 1 levaduras) presentaron la capacidad de desarrollarse bajo las condiciones de presión (100% agua residual, 25% medio de cultivo), lo que permitió descartar, para este trabajo, el resto de aislamientos; con base en esto se realizaron los ensayos con los 4 aislamientos de donde se determinó que con el aislamiento 19 se obtuvieron los mejores resultados de degradación de la DQO.

Mediante pruebas bioquímicas se logró identificar el aislamiento 19, el cual correspondía a la levadura *Rhodotorula rubra*; esta levadura fue la que presentó mejores resultados al proceso de adaptación a las condiciones del agua residual de la empresa estudiada, razón por la cual fue la que finalmente se empleó en los procesos de biodegradación.

Al igual que muchos procesos de biodegradación, el tratamiento estudiado en este proyecto tiene la necesidad de suministro de un cosustrato dentro del mismo, que favorezca el crecimiento del microorganismo y los mecanismos de biodegradación.

Se determinó un medio de cultivo compuesto por 3 g/L de glucosa y 1.5 g/L de peptona, con el cual se pudo trabajar y utilizar en el proceso de biodegradación y crecimiento del microorganismo presente en las aguas residuales de la empresa.

A partir de los diseños de experimentos y su análisis estadístico se logró determinar que el proceso de biodegradación de las aguas residuales de la empresa no requería ser llevado a cabo con la esterilización del agua antes

de ser inoculada con el microorganismo, permitiendo reducir costos y simplificar el proceso.

Mediante el análisis de un blanco de degradación llevado a cabo con las condiciones de operación final (3g/L glucosa, 1.5 g/L peptona, 100rpm) se determinó la importancia de la presencia del microorganismo seleccionado dentro del proceso de biodegradación, ya que este presenta remociones más altas que dicho blanco.

Las condiciones de operación finales para proceso de biodegradación brindan un delta en remoción de la Demanda Química de Oxígeno de 9528.83 gr O₂/L que representa porcentaje de remoción promedio de 92.8%, el cual cumple con las condiciones impuestas por la legislación actual para el vertimiento de aguas residuales.

Las cinéticas de crecimiento evaluadas para el microorganismo aislado de las aguas del vertimiento de la empresa, ayudan a corroborar y comprender el comportamiento del proceso junto con las cinéticas de biodegradación, programadas a partir del diseño de experimentos.

Ante la conclusión de no poder estandarizar un método que permitiera la cuantificación de biodegradación de color, se puede decir que había interferencia entre la medición del color y la presencia del microorganismo y los sólidos en suspensión, además de la fluctuación entre las muestras de agua residual provenientes de la empresa.

La implementación del proceso de biodegradación trabajado en este proyecto, permite el cumplimiento de la norma de vertimiento con respecto a la Demanda Química de Oxígeno, estipulada en el Decreto 1594/1984, ya que se logran remociones en dicha variable superiores al 80%.

El diseño básico conceptual del proceso de biodegradación del agua residual de la empresa estudiada, brinda un acercamiento a la implementación del proceso con la información básica necesaria de condiciones de operación, características de los equipos a emplear y los procedimientos requeridos por el proceso.

El estudio de prefactibilidad económica indica que la mejor alternativa de implementación del tratamiento en estudio en la empresa en cuestión, se basa en la financiación del proyecto en un 40% con un valor presente neto de \$-47.38.356,01 estimado como el menos costoso de los escenarios planteados.

9. RECOMENDACIONES

Evaluar la degradación del contenido orgánico lograda por el microorganismo 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 microorganismo en el agua residual, el tiempo total del proceso de biodegradación con su respectiva viabilidad económica.

Evaluar la implementación técnica de diferentes tipos de cosustratos empleados a escala industrial para procesos biológicos, ya que el uso de glucosa y peptona grado reactivo es costoso.

Realizar un análisis equivalente al que se planteó en este proyecto pero con consorcios comerciales, para evaluar el proceso de biodegradación con los mismos y verificar si mejora la remoción de la Demanda Química de Oxígeno.

10. BIBLIOGRAFÍA

ADOSINDA, MARTINS, JOAO, ARMANDO, SILVESTRE, NELSON. 2002. Relationship of chemical Structures of textile dyes on the preadaptation medium and the potentialities of their biodegradation by *Phanerochaete chrysosporium*. En: Research in microbiology (153):361-368

ANÓNIMO 1. 2007. Pseudomonas agar P. Acceso: Diciembre 28 de 2007. <http://www.britanialab.com.ar/esp/productos/b02/pseudoagarp.htm>

ANÓNIMO 2. 2007. Pseudomonas agar F. Acceso: Diciembre 28 de 2007. <http://www.britanialab.com.ar/esp/productos/b02/pseudoagarf.htm>

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

BACA. 1998. Ingeniería Económica. Quinta edición. Editorial Fondo Educativo Panamericano. Bogotá, Colombia.

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

CARRILLO. 2007. Los hongos de los alimentos y forrajes. Acceso: Diciembre 21 de 2007. <http://www.unsa.edu.ar/matbib/hongos/09htextolevaduras.pdf>

CEPIS (CENTRO PANAMERICANO DE INGENIERÍA SANITARIA Y CIENCIAS DEL AMBIENTE). 1992. Base de datos: Inventario de residuos industriales. Lima, CEPIS. INFORME TECNICO SOBRE MINIMIZACION DE RESIDUOS EN LA INDUSTRIAL TEXTIL. Acceso: Diciembre 17 de 2007. <http://www.cepis.ops-oms.org/cdromrepi86/fulltexts/eswww/fulltext/gtz/minitext/mtextil.html>

COSS. 1986. Análisis y evaluación de proyectos de inversión. Segunda edición. Editorial Limusa. México.

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

CRITES, TCHOBANOGLOUS. 2000. Tratamiento de aguas residuales en pequeñas poblaciones. Edit. McGraw-Hill. Colombia.

CSUROS, CSUROS. 1999. Microbiological examination of water and wastewater. Lewis Publishers. Boca Raton, London, New York, Washington D.C

DÉAK, BEUCHAT. 1996. Handbook of Food Spoilage Yeasts. CRC Press, Boca Raton, Florida.

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

ESCOBAR. 2005. El diseño conceptual. Universidad EAFIT.

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

FRANCO, VARGAS, MENDOZA, BAYONA, PLAZA. 2008. Determinación de *escherichia coli* 0157 a partir de productos cárnicos y lácteos artesanales empleando dos sistemas de aislamiento. Acceso Enero 15 de 2007. http://www.javeriana.edu.co/universitas_scientiarum/VOL6N1/ART3.htm

GARCÍA, MÁRQUEZ, GENÉ. 2002. Infecciones humanas por levaduras negras del género *Exophiala*. Microbiología, Facultad de Medicina, España. En: revista Iberomercana de Micología, (19), p.p 72-79.

GARDINER, BORNE. 1978. Textile waste waters; treatment and environmental effects. Stevenage, Water Research Centre.

IZQUIERDO, CUNILL, TEJERO, IBORRA, FITÉ. 2004. Cinética de las reacciones químicas. Edicions universitat Barcelona. España.

JARAMILLO, ECHEVERRI, FIGUEROA. 2006. Marcha microbiológica para la búsqueda e identificación de *pseudomonas* con potencial de degradar fenol, en ambientes de recepción de aguas residuales generadas en laboratorios de la Universidad de San Buenaventura Cartagena, Colombia. Acceso Enero 9 de 2008. http://www.usbctg.edu.co/academica/pregrado/documentos/bac_sem_artbroc_al02.pdf

KONEMAN, ALLEN, JANDA, SOMMERS, DOWELL. 1997. Hill, Washington. Diagnóstico Microbiológico. México. En: Médica Panamericana, p 307,420.

- LENNTECH. 2000. Calidad del agua: el pH. Acceso: Diciembre 18 de 2007.
<http://www.lenntech.com/espanol/pH-y-alcaldinidad.htm>
- LEVIN, GEALT. 1997. Biotratamiento de residuos tóxicos y peligrosos. Selección, estimación, y modificación de microorganismos y aplicaciones. Primera edición. Editorial McGraw-Hill.
- LOWRY, ROSEBROUGH, FARR, RANDALL. 1951. En: Journal Biol. Chem. 193: p.p 265-275.
- MADIGAN, MARTINKO, PARKER. 1999. Biología de los microorganismos. Octava edición. Editorial Prentice hall. Madrid, España.
- MAIMONE. 2004. Pseudomonas aeruginosa. Acceso: Enero 16 de 2008.
<http://www.codeinep.org/CONTROL/pseudomonasaeruginosa.htm>
- MATCHES. 2003. Equipment Costs. Acceso: Diciembre 17 de 2007.
<http://www.matche.com/>
- MATEOS. 2007. Nutrición de los microorganismos. Facultad de Farmacia. Universidad de Salamanca. Acceso: Enero 2 de 2008.
<http://nostoc.usal.es/sefin/MI/tema05MI.html>
- MATEOS. 2007. Cultivo de los microorganismos: medios de cultivo. Departamento de Microbiología y Genética. Acceso: Marzo 1 de 2007.
<http://coli.usal.es/web/educativo/micro2/tema06.html>
- MERCK. 2006. Catálogo de Productos. USA. p.p 153.
- METCALF-EDDY. 1994. Ingeniería sanitaria tratamiento, evacuación y reutilización de aguas residuales. Segunda edición. Editorial labor s.a.
- MINAMBIENTE. 2006. Ministerio del Medio Ambiente y Desarrollo Territorial. Decreto 1594 de 1984. Acceso: Mayo 17 de 2007.
<http://www.minambiente.gov.co/portal/default.aspx>

MORATO, SUBIRANA, GRIS, CARNEIRO, PASTOR. 2006. Tecnologías sostenibles para la potabilización y el tratamiento de aguas residuales. En: revista lasallista de investigación. Vol 3 (1), p,p. 19-29.

PAJARES, O. 2007. Microorganismos indicadores de la calidad del agua de consumo humano en Lima metropolitana. Acceso: Diciembre 28 de 2007. http://sisbib.un.m.sm.edu.pe/BibVirtualData/Tesis/Basic/Marchand_P_E/anexos.pdf

PEARCE, LLOYD, GUTHRIE. 2001. The removal of colour from textile wastewater using whole bacterial cells: a review. En: Dyes and pigments (58): p.p 179-196.

QUINCHÍA, GÓMEZ, PENAGOS, GIRALDO. 2006. Evaluación de la resistencia de un aislado bacteriano nativo compatible con *pseudomona sp.* al insecticida Lorsban 4 ec. En: Revista EIA. Escuela de Ingeniería de Antioquia (5): p.p 101-108.

SANDHYA, PADMAVATHY, SWAMINATHAN, SUBRAHMANYAM, KAUL. 2005. Microaerophilic-aerobic sequential batch reactor for treatment of azo dyes containing simulated wastewater. En: Process Biochemistry (40): p.p. 885-890

SARNAIK, KANEKAR. 1999. Biodegradation of methyl violet by *Pseudomonas mendocina* MCM B-402. En: Microbiol Biotechnol (52): p.p. 251-254.

SEIDER, SEADER, LEWIN. 1999. Process Design Principles. Synthesis, analysis, and evaluation. John Wiley & Sons, Inc. United States of America.

TALARPOSHTI, MAHDAVI, ANDERSON. 2000. Colour removal from a simulated dye wastewater using a two-phase anaerobic packed bed reactor. En: Water Resistant. Vol. 35 (2): p.p. 425-432.

TURTON, BAILIE, WHITING, SHAEIWITZ. 2003. Analysis, Synthesis ,and Design of Chemical Processes. Segunda edición. Editorial Prentice hall.

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE. 2007. Guía de prácticas de microbiología clínica. Facultad de farmacia. Departamento de Microbiología II. Acceso Enero 16 de 2008. <http://www.ucm.es/info/mfar/pdfs/GuiaClinica.PDF>

ANEXOS

Anexo I. Decreto 1594 de 1984 (normatividad de efluentes) (Minambiente, 2006)

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

0.0864: 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 II. Caracterización de Agua Residual

Página 1 de 5 Acreditación No. 3080 Mayo 16 de 2004	Laboratorio de Química Ambiental Facultad de Ciencias Ambientales Universidad Tecnológica de Pereira INFORME DE ENSAYO 0105 - 07	
---	---	---

R3

Pereira, julio 16 de 2007

INFORME DE RESULTADOS: 0105 - 07
NÚMERO DE ÓRDEN: 105

1. **CONTRATANTE:** Proceso y color S.A.
Zona Industrial antigua plaza de ferias
Dosquebradas - Risaralda

2. **PROPÓSITO DEL ANÁLISIS:** control

3. DESCRIPCIÓN DE LAS MUESTRAS

- Procedencia: Proceso y color S.A.
- Código y denominación de las muestras:

070704 - 105/1: **Afluente tratamiento preliminar primera integración**
070704 - 105/2: **Efluente tratamiento preliminar primera integración**
070704 - 105/3: **Afluente tratamiento preliminar segunda integración**
070704 - 105/4: **Efluente tratamiento preliminar segunda integración**

4. TOMA DE MUESTRA:

- Responsable: Ingeniera Ana María Galeano. Asignada por la empresa contratante
- Descripción de la toma de muestra: no aplica

5. ENSAYO

- Recepción de Muestras: 2007-07-04



R3

- Fecha de ejecución de los ensayos:

Ensayo	Fecha	Ensayo	Fecha	Ensayo	Fecha
Demanda Bioquímica de Oxígeno	2007-07-05	Demanda Química de Oxígeno	2007-07-06	pH	2007-07-04
Sólidos sedimentables	2007-07-06	Sólidos suspendidos totales	2007-07-09	Turbiedad	2007-07-05

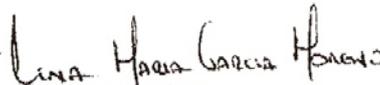
6. MÉTODOS ANALÍTICOS: Anexo 1 (1 Página)

7. DATOS DE CAMPO: No aplica

8. RESULTADOS DE ENSAYOS: Anexo 2 (2 Páginas)

9. COMPLEMENTOS DEL INFORME: No aplica

Elaborado: 
Responsable de área
Laboratorio de Química Ambiental


Revisado / Aprobado
Lina María García Moreno
Jefe de laboratorio
Laboratorio de Química Ambiental

Notas:

- 1- Los resultados de los ensayos solamente se refieren a las muestras analizadas.
- 2- Este informe solo puede reproducirse en su totalidad. Las reproducciones parciales deberán ser aprobadas por escrito por parte del laboratorio.
- 3- Sólo se aceptarán reclamos dentro de los treinta días calendario siguientes a la entrega de este informe.
- 4- A los resultados de ensayo incluidos dentro del alcance de la acreditación debe asociarse la incertidumbre declarada en el anexo 1



UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA - NIT 84.480.059 - APRECIADO ASESORÍA AMBIENTAL - TEL: 032 4447300 - FAX: 032 4447300 - PEREIRA - CALDAS - COLOMBIA - WWW.UTP.PEJ.CO

ANEXO 1 MÉTODOS ANALÍTICOS

ALCANCE DE LA ACREDITACIÓN		
ENSAYO	MÉTODO ANALÍTICO	INCERTIDUMBRE EXPANDIDA
Durezas Cálcica, Magnésica y total	Potenciométrico Método: 4500-43-B	± 0,004
Sólidos Suspendidos Totales (SST)	Gravimétrico Método: 2540-D	± 0,01 mg/L
Oxígeno Disuelto (OD)	Electrodo de membrana Método: 4500-O-G	± 0,002 mg O ₂ /L
Fósforo Total	Fotométrico Método: 4500-P	± 0,1 mg P-PO ₄ /L
Conductividad	Electrodo Método: 2510-B	Rango Bajo: ± 0,003 uS/cm Alto: ± 0,005 uS/cm
Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO)	Electrodo de membrana Método: 5210-B	± 0,1 mg O ₂ /L
Demanda Química de Oxígeno (DQO)	Reflujo con dicromato Micro Método: 5220-C	± 5,6 mg O ₂ /L

ENSAYOS FUERA DEL ALCANCE DE LA ACREDITACIÓN					
ENSAYO	MÉTODO ANALÍTICO	ENSAYO	MÉTODO ANALÍTICO	ENSAYO	MÉTODO ANALÍTICO
Durezas Cálcica, Magnésica y total	Volumétrico Electrodoión selectivo de calcio Método: 2340-C	Sólidos Suspendidos Fijos (SSF)	Gravimétrico Método: 2540-E	Sólidos Totales Volátiles (STV)	Gravimétrico Método: 2540-B
Olor	Comparador visual	Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV)	Gravimétrico Método: 2540-D	Sulfatos	Fotométrico Método: 4500-SO ₄ -F
Nitrógeno Kjeldahl	Semi micro Kjeldahl Método: 4500-NH ₃ -C	Alcalinidad	Potenciométrica Método: 2520-B	Sulfuros	Yodométrico Método: 4500-SO ₃ -F
Grasas y Aceites	Extracción Soxhlet Gravimétrico Método: 5520-D	Nitritos	4500-NO ₂ -B	Demanda Química de Oxígeno (DQO)	Macro-Método: 5220-B
Nitritos	4500-NO ₂ -B	Nitratos	4500-NO ₃ -B	Turbiedad	Nefelométrico Método: 2130-B
Nitrógeno Amoniacal (N-NH ₃)	Método: 4500-NH ₃ -C	Sólidos Totales (ST)	Gravimétrico Método: 2540-B	Prueba de Jarras	Test de jarras
Detergentes	Sustancias activas al azú de metileno Método: 5540-C	Sólidos Disueltos Totales (SDT)	Gravimétrico Método: 2540-C	Metalos pesados	Absorción atómica Horno de grafito Métodos: 3111-B, 3111-D
Cloruros	Potenciométrico Método: 4500-CL-D	Sólidos Disueltos Volátiles (SDV)	Gravimétrico Método: 2540-C	Arsénico y Mercurio	Generador de hidruros As: Método: 3114-C Hg: Método: 3112-B
Oxígeno Disuelto (OD)	Yodométrico Método: 4500-O-C	Sólidos Disueltos Fijos (SDF)	Gravimétrico Método: 2540-E	Análisis Microbiológico	9221 - 9222 9215 9230
Acidoz	Potenciométrico Método: 2310-B	Sólidos Fijos Totales (SFT)	Gravimétrico Método: 2540-E		
Sólidos Sedimentables (Ssed)	Conc. nifrot Método: 2540-F				

NOTA Los métodos analíticos corresponden a lo establecido en el Standard Methods for the examination of water and wastewater.



R3

ANEXO 2 RESULTADOS DE ENSAYOS

IDENTIFICACION DE LA MUESTRA				
Afluyente tratamiento preliminar primera integración			Fecha de Muestreo 2007-07-04	Hora: 08:00 - 12:00
Tipo de muestra:	<input checked="" type="checkbox"/> Simple <input type="checkbox"/> Compuesta	<input type="checkbox"/> Integrada <input type="checkbox"/> Otro	Código de muestra 070704 - 105/1	
RESULTADOS DE ENSAYOS FISICOQUÍMICOS, METALES Y MICROBIOLÓGICOS				
Código	Ensayo	Unidades	Incertidumbre	Resultado
6	Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO)	mg O ₂ /L	+/- 0,1 mg O ₂ /L	930
7	Demanda Química de Oxígeno (DQO)	mg O ₂ /L	+/- 5,6 mg O ₂ /L	2212
1	pH	pH	+/- 0,004	6,52 a 25°C
18	Sólidos sedimentables a 10 min	mL/L	NE	4,5
18	Sólidos sedimentables a 60 min	mL/L	NE	4,5
2	Sólidos Suspensidos Totales (SST)	mg/L	+/- 0,01 mg/L	431
30	Turbiedad	NTU	NE	422

IDENTIFICACION DE LA MUESTRA				
Efluente tratamiento preliminar primera integración			Fecha de Muestreo 2007-07-04	Hora: 08:00 - 12:00
Tipo de muestra:	<input checked="" type="checkbox"/> Simple <input type="checkbox"/> Compuesta	<input type="checkbox"/> Integrada <input type="checkbox"/> Otro	Código de muestra 070704 - 105/2	
RESULTADOS DE ENSAYOS FISICOQUÍMICOS, METALES Y MICROBIOLÓGICOS				
Código	Ensayo	Unidades	Incertidumbre	Resultado
6	Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO)	mg O ₂ /L	+/- 0,1 mg O ₂ /L	386
7	Demanda Química de Oxígeno (DQO)	mg O ₂ /L	+/- 5,6 mg O ₂ /L	484
1	pH	pH	+/- 0,004	6,77 a 25°C
18	Sólidos sedimentables a 10 min	mL/L	NE	2,0
18	Sólidos sedimentables a 60 min	mL/L	NE	3,0
2	Sólidos Suspensidos Totales (SST)	mg/L	+/- 0,01 mg/L	370
30	Turbiedad	NTU	NE	257



R3

IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA				
Afluente tratamiento preliminar segunda integración			Fecha de Muestreo 2007-07-04	Hora: 12:00 - 16:00
Tipo de muestra:	<input checked="" type="checkbox"/> Simple <input type="checkbox"/> Compuesta	<input type="checkbox"/> Integrada <input type="checkbox"/> Otro	Código de muestra: 070704 - 105/3	
RESULTADOS DE ENSAYOS FISICOQUÍMICOS, METALES Y MICROBIOLÓGICOS				
Código	Ensayo	Unidades	Incertidumbre	Resultado
6	Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO)	mg O ₂ /L	+/- 0,1 mg O ₂ /L	142
7	Demanda Química de Oxígeno (DQO)	mg O ₂ /L	+/- 5,6 mg O ₂ /L	408
1	pH		+/- 0,004	4,96 a 25°C
18	Sólidos sedimentables a 10 min	mL/L	NE	4,0
18	Sólidos sedimentables a 60 min	mL/L	NE	5,0
2	Sólidos Suspendidos Totales (SST)	mg/L	+/- 0,01 mg/L	287
30	Turbiedad	NTU	NE	1/0

IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA				
Efluente tratamiento preliminar segunda integración			Fecha de Muestreo 2007-07-04	Hora: 12:00 - 16:00
Tipo de muestra:	<input checked="" type="checkbox"/> Simple <input type="checkbox"/> Compuesta	<input type="checkbox"/> Integrada <input type="checkbox"/> Otro	Código de muestra: 070704 - 105/4	
RESULTADOS DE ENSAYOS FISICOQUÍMICOS, METALES Y MICROBIOLÓGICOS				
Código	Ensayo	Unidades	Incertidumbre	Resultado
6	Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO)	mg O ₂ /L	+/- 0,1 mg O ₂ /L	103
7	Demanda Química de Oxígeno (DQO)	mg O ₂ /L	+/- 5,6 mg O ₂ /L	305
1	pH		+/- 0,004	6,93 a 25°C
18	Sólidos sedimentables a 10 min	mL/L	NE	<0,5
18	Sólidos sedimentables a 60 min	mL/L	NE	1,0
2	Sólidos Suspendidos Totales (SST)	mg/L	+/- 0,01 mg/L	152
30	Turbiedad	NTU	NE	142

OBSERVACIONES GENERALES:

NE = No Estimada

Ω.

Anexo III. 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 tomó 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

Anexo IV. Protocolo del Método de Lowry

MANUAL DE PROCEDIMIENTOS Laboratorio de Biotecnología

Julio 2005

Versión 1

MP02-729715

DETERMINACION DE PROTEINAS POR EL MÉTODO DE LOWRY

1. Objetivo

Este procedimiento tiene como objetivo, hacer uso de la ley de Beer-Lambert para determinar la concentración de proteínas en una muestra problema haciendo uso del reactivo de Folin Ciocalteu's

2. Fundamentos teóricos

El método de Lowry (1951) es un método colorimétrico de valoración cuantitativa de las proteínas, a la muestra se añade un reactivo que forma un complejo coloreado con las proteínas, siendo la intensidad de color de la disolución resultante proporcional a la concentración de proteínas, según la ley de Beer. Este método consta de dos etapas: en la primera, los iones Cu^{2+} , en medio alcalino, se unen a las proteínas formando complejos con los átomos de nitrógeno de los enlaces peptídicos. Estos complejos Cu^{2+} -proteína tienen un color azul claro; además, provocan el desdoblamiento de la estructura tridimensional de la proteína, exponiéndose los residuos de tirosina que van a participar en la segunda etapa de la reacción. El Cu^{2+} se mantiene en solución alcalina en forma de su complejo con tartrato. En la segunda etapa, el cobre actúa como catalizador de la reducción, también en medio básico, del reactivo de Folin-Ciocalteu's, por parte de los grupos fenólicos de los residuos de tirosina, presentes en la mayoría de las proteínas. El principal constituyente del reactivo de Folin-Ciocalteu's es el ácido fosfomolibdotúngstico, de color amarillo, que al ser reducido por los fenoles da lugar a un complejo de color azul intenso.

3. Equipos: Beakers y tubos de ensayo lisos limpios y secos, balanza digital con exactitud hasta la décima de mg, micropipetas, espectrofotómetro y cubetas, vortex, gradillas metálicas, puntas azules y amarillas

4. Reactivos: Reactivo Folin Ciocalteu's 1:1, stock de BSA (albúmina suero bovino) 400 mg/l, solución NaOH 2N, solución A: Na_2CO_3 al 2%, solución B: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 1%, solución C: Tartrato de sodio y potasio al 2%, solución acomplejante, solución de NaCl al 0.9%

5. Preparación de reactivos

- **Preparación de la solución stock de BSA:** tomar 0.0400 gr de BSA grado analítico con exactitud hasta la décima de mg, disolver suavemente, aforar a 100 ml con agua desionizada, empacar en viales, rotular y almacenar en congelador para su posterior uso.
- **Preparación reactivo Folin 1:1:** Tomar 50 ml del reactivo de Folin comercial y 50 ml de agua desionizada; en balón de aforo, mezclar, envasar en frasco ámbar y rotular con fecha de vencimiento incluida, se debe mantener refrigerada a 4 °C.
- **Solución NaOH 2N:** Pesar 80.0 gr/l de NaOH grado reactivo, con exactitud hasta la décima de gr, disolver y aforar con agua desionizada, envasar y rotular
- **Solución de Na_2CO_3 al 2%:** Pesar 20.0 gr/l de Na_2CO_3 grado reactivo, con exactitud hasta la décima de gr, disolver y aforar con agua desionizada, envasar y rotular, esta solución debe ser preparada cada vez que se haga cualquier ensayo.
- **Solución de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 1%:** Pesar 10.0 gr/l de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ grado reactivo, con exactitud hasta la décima de gr, disolver y aforar con agua desionizada, envasar y rotular.
- **Tartrato de sodio y potasio al 2%:** Pesar 20.0 g/l de tartrato de Na y K grado reactivo, con exactitud hasta la décima de gr, disolver y aforar con agua desionizada, rotular.
- **Solución de NaCl al 0.9%:** Pesar 9.0 g/l de NaCl grado reactivo, con exactitud hasta la décima de gr, disolver y aforar con agua desionizada, envasar y rotular.
- **Solución acomplejante:** Mezclar en una proporción 100:1:1 las soluciones A: B: C respectivamente, mezclar y utilizar inmediatamente.

Determinación de proteínas con el método de Lowry
LABORATORIO DE PROCESOS
Universidad EAFIT

MANUAL DE PROCEDIMIENTOS
Laboratorio de Biotecnología

Julio 2005

Versión 1

MP02-729715

6. Procedimiento

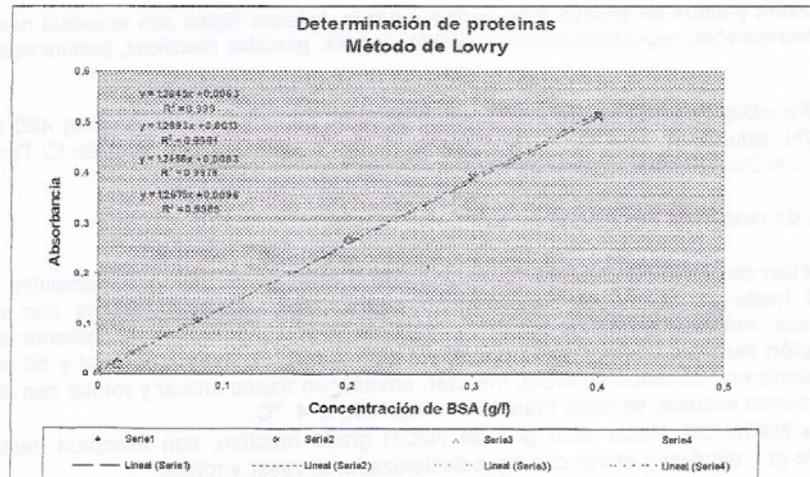
• **Preparación de la curva:**

Nº Dilución	Blanco	1	2	3	4	5
Stock BSA (ml)	0.0	0.020	0.100	0.250	0.375	0.500
NaCl 0.9% NaCl 0.9% (ml)	0.500	0.480	0.400	0.250	0.125	0
Gr/l de BSA	0.0	0.016	0.080	0.2	0.3	0.4

- Preparar en cada tubo 0.5 ml de cada una de las soluciones: De la curva patrón, las muestras problema diluida según sea el caso y NaCl al 0.9% como blanco (ver tabla)
- Adicionar a cada tubo 0.5 ml de NaOH 2N y llevar a ebullición por 10 minutos.
- Dejar enfriar hasta que alcance la temperatura ambiente.
- Agregar a cada tubo 5 ml de la solución acomplejante, vortex y dejar reposar por 10 min.
- Adicionar 0.5 ml del reactivo de Folin-Ciocalteu's 1:1, vortex durante 10 segundos.
- Reposar en un cuarto oscuro durante 30 minutos, leer la absorbancia a 750 nm.

7. Normativa

- Se debe tener una buena linealidad para leer las muestras; el coeficiente de correlación debe ser como mínimo de 0.990 y la mejor curva debe pasar por el origen; sobre todo para bajas concentraciones en la muestra problema, de lo contrario se debe repetir el ensayo.



- La curva de calibración debe ser comparable con la validada por el laboratorio de lo contrario se debe repetir el ensayo (verificar si el reactivo de folin está vencido y en buen estado y que el stock de BSA no este fermentado).
- La ley de Beer-Lambert solo es aplicable a bajas concentraciones al elaborar la curva de calibración, los rangos de linealidad de las curvas de absorbancia vs. concentración para el caso de la albúmina BSA está entre 0.0 – 0,8 g/l
- Se debe hacer por cada ensayo, la curva de calibración y las muestras por duplicado.
- Para muestras con altas concentraciones proteínas no es consistente la relación lineal entre absorbancia y concentración por lo tanto las muestras deben ser diluidas según el contenido de proteína. Algunas diluciones pueden ser al 5%, 10% y 20%

Anexo V. Resultado Identificación Bioquímica del Microorganismo.

	INFORME DE RESULTADOS		
FGR-02	Versión 02	Reporte: 07-395	Página: 1 de 1

1. INFORMACION DEL CLIENTE

Cliente: ANA MARIA GALEANO	
NIT/ C.C:	
Dirección:	
Teléfono:	Fax:
Contacto:	Cargo:

2. IDENTIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS (4)

Muestreado por:	
Sitio de muestreo:	
Fecha y hora de recepción:	14- 12- 2007
Fecha y hora de Muestreo:	

3. TÉCNICAS UTILIZADAS

Identificación levadura	Microscopia y pruebas bioquímicas
--------------------------------	-----------------------------------

4. RESULTADOS DE LABORATORIO

Identificación levadura	De acuerdo a las observaciones microscópicas y a los resultados de las pruebas bioquímicas se identificó la levadura como <u>Rhodotorula rubra</u>
--------------------------------	--

Notas

Los resultados entregados sólo son válidos para las muestras analizadas y de carácter confidencial

Las muestras fueron entregadas por el interesado al laboratorio

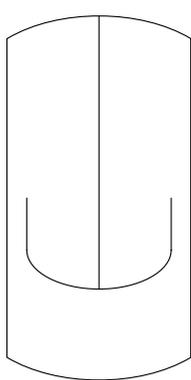
Por ningún motivo debe hacerse reproducción total o parcial del presente informe sin la autorización de GDCON

Nancy Johanna Pino Rodriguez

Microbióloga y Bioanalista

Reg 5-1636-06

Anexo VII. Fichas Técnicas Equipos

TANQUES TK-102 TK-103			
Identificación:	Item Vessel/		
	Item N°	TK-102	TK-103
	N° requerido	2	
Función:	Contener la mezcla en tratamiento de biodegradación, agua en proceso más los microorganismos		
Operación:	Batch		
Condiciones de diseño			
Presión de operación	101.325 Kpa	Temperatura de operación	28°C
Presión de diseño	170.301 Kpa	Temperatura de diseño	45°C
Prueba hidrostática [Kpa]	N.A		
Prueba "Hammer Test" [Kpa]	N.A		
Datos mecánicos:			
Orientación	Vertical		
Relación Altura/Diámetro	3 m		
Diámetro interno	0.834 m		
Diámetro	0.847 m		
Altura Mist desde fondo vessel	2.5 m		
Volumen de residencia	20 m ³		
Tiempo de residencia	48 h		
Volumen total	21.9 m ³		
Grosor Mist	6.4 mm		
Espesor platos	N.D		
Manhole torre [m]	N.D		
Materiales de construcción			
Coraza	Acero al carbón 1020		
Cabezas	Acero al carbón 1020		
Soporte	Concreto		
	ELABORÓ	Lukas Osorio – Ana Galeano	
	REVISÓ	Catalina Giraldo	
	FECHA	Diciembre de 2007	
			Revisión 1

**TANQUE
TK-101**

Identificación: **Item Vessel/**
 Item N° TK-101
 N° requerido

Función: Mantener el microorganismo en crecimiento para ser inoculado en el proceso de biodegradación

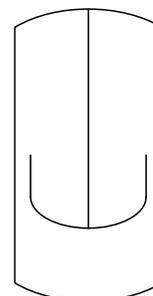
Operación: Continuo

Condiciones de diseño

Presión de operación	101.325 Kpa	Temperatura de operación	28°C
Presión de diseño	170.301 Kpa	Temperatura de diseño	45°C
Prueba hidrostática [Kpa]	N.A		
Prueba "Hammer Test" [Kpa]	N.A		

Datos mecánicos:

Orientación	Vertical
Relación Altura/Diámetro	3 m
Diámetro interno	0.43 m
Diámetro	0.443 m
Altura Mist desde fondo vessel	1.29 m
Volumen de residencia	2 m ³
Tiempo de residencia	48 h
Volumen total	3 m ³
Grosor Mist	6.4 mm
Espesor platos	N.D
Manhole torre [m]	N.D
Materiales de construcción	
Coraza	Acero al carbón 1020
Cabezas	Acero al carbón 1020
Soporte	Patas acero al carbón



ELABORÓ

Lukas Osorio – Ana Galeano

REVISÓ

Catalina Giraldo

FECHA

Diciembre de 2007

Revisión
1

**TANQUES
TK-104**

Identificación: **Item Vessel/**
 Item N° TK-104
 N° requerido 1

Función: Contener la mezcla del agua tratada con microorganismos para facilitar su separación por sedimentación.

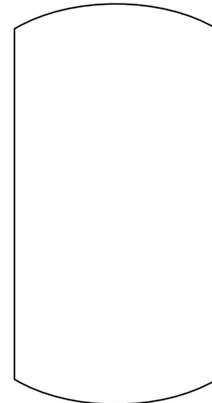
Operación: Batch

Condiciones de diseño

Presión de operación	101.325 Kpa	Temperatura de operación	28°C
Presión de diseño	170.301 Kpa	Temperatura de diseño	45°C
Prueba hidrostática [Kpa]	N.A		
Prueba "Hammer Test" [Kpa]	N.A		

Datos mecánicos:

Orientación	Vertical
Relación Altura/Diámetro	3 m
Diámetro interno	0.834 m
Diámetro	0.847 m
Altura Mist desde fondo vessel	2.5 m
Volumen de residencia	20 m ³
Tiempo de residencia	48 h
Volumen total	21.9 m ³
Grosor Mist	6.4 mm
Espesor platos	N.D
Manhole torre [m]	N.D
Materiales de construcción	
Coraza	Acero al carbón 1020
Cabezas	Acero al carbón 1020
Soporte	Concreto



ELABORÓ

Lukas Osorio – Ana Galeano

REVISÓ

Catalina Giraldo

FECHA

Diciembre de 2007

Revisión
1

BOMBA
P-101 A/B P-103

Identificación: **Item Bomba**
 Item N° P-101 A/B P-103
 N° requerido 3

Función: -Transportar el agua residual desde el proceso de teñido y lavado hacia los tanques de biodegradación
 -Descargar el tanque de biodegradación hacia el tanque de separación

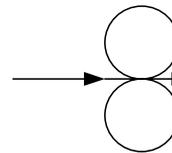
Operación: Batch

Condiciones de diseño

Fluido	Agua Residual		
Flujo (m ³ /h)	0.9125		
Presión de operación	101.325 Kpa	Temperatura de operación	20°C
Presión de diseño	170.301 Kpa	Temperatura de diseño	45°C

Condiciones de Operación

Capacidad (m ³ /h)	0.833
Potencia (KW)	0.05
Duty (KW)	0.05
Eficiencia (%)	55
Δ Presión (Kpa)	120
Tipo de Bomba	Rotativa
NPSH _D	
Materiales de construcción	
Coraza	Acero al carbón 1020
Cabezas	Acero al carbón 1020



	ELABORÓ	Lukas Osorio – Ana Galeano	Revisión 1
	REVISÓ	Catalina Giraldo	
	FECHA	Diciembre de 2007	

**BOMBA
P-102 A/B**

Identificación: **Item** Bomba
 Item N° P-102 A/B
 N° requerido 2

Función: -Transportar el preinóculo desde el tanque de preinóculos hasta los tanques de biodegradación

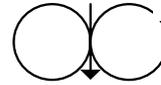
Operación: Batch

Condiciones de diseño

Fluido	Agua + Microorganismo		
Flujo (m ³ /h)	0.125		
Presión de operación	101.325 Kpa	Temperatura de operación	20°C
Presión de diseño	170.301 Kpa	Temperatura de diseño	45°C

Condiciones de Operación

Capacidad (m ³ /h)	0.0833
Potencia (KW)	0.005
Duty (KW)	0.005
Eficiencia (%)	55
Δ Presión (Kpa)	120
Tipo de Bomba	Rotativa
NPSH _D	
Materiales de construcción	
Coraza	Acero al carbón 1020
Cabezas	Acero al carbón 1020



	ELABORÓ	Lukas Osorio – Ana Galeano	Revisió n 1
	REVISÓ	Catalina Giraldo	
	FECHA	Diciembre de 2007	

Anexo VIII. Tablas Análisis Financiero

Proyecto con 30% de Financiación

Tabla Flujo de Efectivo para 30% de Financiación

FLUJO DE CAJA DEL PROYECTO CON FINANCIACION									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Ventas proyectadas		\$38,617,000	\$40,547,850	\$42,575,243	\$44,704,005	\$46,939,205	\$49,286,165	\$51,750,473	\$54,337,997
Costos Operación		\$10,330,000	\$10,846,500	\$11,388,825	\$11,958,266	\$12,556,180	\$13,183,989	\$13,843,188	\$14,535,347
Costos Materia Prima		\$17,343,606	\$18,210,787	\$19,121,326	\$20,077,392	\$21,081,262	\$22,135,325	\$23,242,091	\$24,404,196
Depreciación		\$6,109,958	\$6,109,958	\$6,109,958	\$6,109,958	\$6,109,958	\$6,109,958	\$6,109,958	\$6,109,958
Amortización		\$705,000	\$705,000	\$705,000	\$705,000	\$705,000	\$705,000	\$705,000	\$705,000
Utilidad Operativa		\$4,128,436	\$4,675,605	\$5,250,134	\$5,853,388	\$6,486,806	\$7,151,894	\$7,850,236	\$8,583,496
Intereses		\$3,296,623	\$3,093,549	\$2,850,754	\$2,560,468	\$2,213,402	\$1,798,451	\$1,302,335	\$709,178
Utilidad antes de impuestos		\$831,813	\$1,582,057	\$2,399,380	\$3,292,920	\$4,273,403	\$5,353,443	\$6,547,902	\$7,874,318
Impuestos		\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0
Utilidad Operativa despues de impuestos		\$831,813	\$1,582,057	\$2,399,380	\$3,292,920	\$4,273,403	\$5,353,443	\$6,547,902	\$7,874,318
Préstamo	\$16,853,899								
Depreciación		\$6,109,958	\$6,109,958	\$6,109,958	\$6,109,958	\$6,109,958	\$6,109,958	\$6,109,958	\$6,109,958
Amortización		\$705,000	\$705,000	\$705,000	\$705,000	\$705,000	\$705,000	\$705,000	\$705,000
Amortización Capital		\$1,038,210	\$1,241,283	\$1,484,078	\$1,774,364	\$2,121,430	\$2,536,381	\$3,032,498	\$3,625,654
Inversion incremental en capital de trabajo		\$0	\$250,000	\$262,500	\$275,625	\$289,406	\$303,877	\$319,070	\$335,024
Inversión Inicial	\$51,179,662								
Capital de trabajo	\$5,000,000								
Total Inversion + Capital	\$56,179,662								
Flujo de Caja Neto	-\$39,325,763	\$6,608,561	\$6,905,731	\$7,467,759	\$8,057,889	\$8,677,525	\$9,328,143	\$10,011,291	\$10,728,598

Tabla Pago de la Deuda para 30% de Financiación

Sistema amortizacion:	Cuota Fija				
Deuda	\$16,853,899				
Tasa interés (EA)	19.56%				
Plazo	8				
Cuota fija:	\$4,334,832.15				
	Saldo inicial	Cuota	Interes	Abono Capital	Saldo Final
					\$16,853,898.60
1	\$16,853,898.60	\$4,334,832.15	\$3,296,622.57	\$1,038,209.59	\$15,815,689.01
2	\$15,815,689.01	\$4,334,832.15	\$3,093,548.77	\$1,241,283.38	\$14,574,405.63
3	\$14,574,405.63	\$4,334,832.15	\$2,850,753.74	\$1,484,078.41	\$13,090,327.22
4	\$13,090,327.22	\$4,334,832.15	\$2,560,468.00	\$1,774,364.15	\$11,315,963.07
5	\$11,315,963.07	\$4,334,832.15	\$2,213,402.38	\$2,121,429.78	\$9,194,533.29
6	\$9,194,533.29	\$4,334,832.15	\$1,798,450.71	\$2,536,381.44	\$6,658,151.85
7	\$6,658,151.85	\$4,334,832.15	\$1,302,334.50	\$3,032,497.65	\$3,625,654.19
8	\$3,625,654.19	\$4,334,832.15	\$709,177.96	\$3,625,654.19	\$0.00

Tabla Indicadores de Rentabilidad 30% de Financiación

VPN (Ko')	-\$4,938,322.3
VPN (Precio Constante)	\$1,611,234.2
TIR	12.7%

Proyecto con 40% de Financiación

Tabla Flujo de Efectivo para 40% de Financiación

FLUJO DE CAJA DEL PROYECTO CON FINANCIACION									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Ventas proyectadas		\$38,617,000	\$40,547,850	\$42,575,243	\$44,704,005	\$46,939,205	\$49,286,165	\$51,750,473	\$54,337,997
Costos Operación		\$10,330,000	\$10,846,500	\$11,388,825	\$11,958,266	\$12,556,180	\$13,183,989	\$13,843,188	\$14,535,347
Costos Materia Prima		\$17,343,606	\$18,210,787	\$19,121,326	\$20,077,392	\$21,081,262	\$22,135,325	\$23,242,091	\$24,404,196
Depreciación		\$6,109,958	\$6,109,958	\$6,109,958	\$6,109,958	\$6,109,958	\$6,109,958	\$6,109,958	\$6,109,958
Amortización		\$705,000	\$705,000	\$705,000	\$705,000	\$705,000	\$705,000	\$705,000	\$705,000
Utilidad Operativa		\$4,128,436	\$4,675,605	\$5,250,134	\$5,853,388	\$6,486,806	\$7,151,894	\$7,850,236	\$8,583,496
Intereses		\$4,395,497	\$4,124,732	\$3,801,005	\$3,413,957	\$2,951,203	\$2,397,934	\$1,736,446	\$945,571
Utilidad antes de impuestos		-\$267,061	\$550,874	\$1,449,129	\$2,439,431	\$3,535,602	\$4,753,959	\$6,113,790	\$7,637,925
Impuestos		\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0
Utilidad Operativa despues de impuestos		-\$267,061	\$550,874	\$1,449,129	\$2,439,431	\$3,535,602	\$4,753,959	\$6,113,790	\$7,637,925
Préstamo	\$22,471,865								
Depreciación		\$6,109,958	\$6,109,958	\$6,109,958	\$6,109,958	\$6,109,958	\$6,109,958	\$6,109,958	\$6,109,958
Amortización		\$705,000	\$705,000	\$705,000	\$705,000	\$705,000	\$705,000	\$705,000	\$705,000
Amortización Capital		\$1,384,279	\$1,655,045	\$1,978,771	\$2,365,819	\$2,828,573	\$3,381,842	\$4,043,330	\$4,834,206
Inversion incremental en capital de trabajo		\$0	\$250,000	\$262,500	\$275,625	\$289,406	\$303,877	\$319,070	\$335,024
Inversión Inicial	\$51,179,662								
Capital de trabajo	\$5,000,000								
Total Inversion + Capital	\$56,179,662								
Flujo de Caja Neto	-\$33,707,797	\$5,163,617	\$5,460,787	\$6,022,815	\$6,612,945	\$7,232,581	\$7,883,199	\$8,566,347	\$9,283,654

Tabla Pago de la Deuda para 40% de Financiación

Sistema amortización:	Cuota Fija				
Deuda	\$22,471,865				
Tasa interés (EA)	19.56%				
Plazo	8				
Cuota fija:	\$5,779,776.21				
	Saldo inicial	Cuota	Interes	Abono Capital	Saldo Final
					\$22,471,864.80
1	\$22,471,864.80	\$5,779,776.21	\$4,395,496.75	\$1,384,279.45	\$21,087,585.35
2	\$21,087,585.35	\$5,779,776.21	\$4,124,731.69	\$1,655,044.51	\$19,432,540.84
3	\$19,432,540.84	\$5,779,776.21	\$3,801,004.99	\$1,978,771.22	\$17,453,769.62
4	\$17,453,769.62	\$5,779,776.21	\$3,413,957.34	\$2,365,818.87	\$15,087,950.76
5	\$15,087,950.76	\$5,779,776.21	\$2,951,203.17	\$2,828,573.04	\$12,259,377.72
6	\$12,259,377.72	\$5,779,776.21	\$2,397,934.28	\$3,381,841.92	\$8,877,535.79
7	\$8,877,535.79	\$5,779,776.21	\$1,736,446.00	\$4,043,330.20	\$4,834,205.59
8	\$4,834,205.59	\$5,779,776.21	\$945,570.61	\$4,834,205.59	\$0.00

Tabla Indicadores de Rentabilidad 40% de Financiación

VPN (Ko')	-\$4,738,356.0
VPN (Precio Constante)	\$942,384.7
TIR	11.6%

Proyecto con 50% de Financiación

Tabla Flujo de Efectivo para 50% de Financiación

FLUJO DE CAJA DEL PROYECTO CON FINANCIACION									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Ventas proyectadas		\$38,617,000	\$40,547,850	\$42,575,243	\$44,704,005	\$46,939,205	\$49,286,165	\$51,750,473	\$54,337,997
Costos Operación		\$10,330,000	\$10,846,500	\$11,388,825	\$11,958,266	\$12,556,180	\$13,183,989	\$13,843,188	\$14,535,347
Costos Materia Prima		\$17,343,606	\$18,210,787	\$19,121,326	\$20,077,392	\$21,081,262	\$22,135,325	\$23,242,091	\$24,404,196
Depreciación		\$6,109,958	\$6,109,958	\$6,109,958	\$6,109,958	\$6,109,958	\$6,109,958	\$6,109,958	\$6,109,958
Amortización		\$705,000	\$705,000	\$705,000	\$705,000	\$705,000	\$705,000	\$705,000	\$705,000
Utilidad Operativa		\$4,128,436	\$4,675,605	\$5,250,134	\$5,853,388	\$6,486,806	\$7,151,894	\$7,850,236	\$8,583,496
Intereses		\$5,494,371	\$5,155,915	\$4,751,256	\$4,267,447	\$3,689,004	\$2,997,418	\$2,170,558	\$1,181,963
Utilidad antes de impuestos		-\$1,365,935	-\$480,309	\$498,877	\$1,585,942	\$2,797,802	\$4,154,476	\$5,679,679	\$7,401,533
Impuestos		\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0
Utilidad Operativa despues de impuestos		-\$1,365,935	-\$480,309	\$498,877	\$1,585,942	\$2,797,802	\$4,154,476	\$5,679,679	\$7,401,533
Préstamo	\$28,089,831								
Depreciación		\$6,109,958	\$6,109,958	\$6,109,958	\$6,109,958	\$6,109,958	\$6,109,958	\$6,109,958	\$6,109,958
Amortización		\$705,000	\$705,000	\$705,000	\$705,000	\$705,000	\$705,000	\$705,000	\$705,000
Amortización Capital		\$1,730,349	\$2,068,806	\$2,473,464	\$2,957,274	\$3,535,716	\$4,227,302	\$5,054,163	\$6,042,757
Inversion incremental en capital de trabajo		\$0	\$250,000	\$262,500	\$275,625	\$289,406	\$303,877	\$319,070	\$335,024
Inversión Inicial	\$51,179,662								
Capital de trabajo	\$5,000,000								
Total Inversion + Capital	\$56,179,662								
Flujo de Caja Neto	-\$28,089,831	\$3,718,673	\$4,015,843	\$4,577,871	\$5,168,001	\$5,787,637	\$6,438,255	\$7,121,403	\$7,838,710

Tabla Pago de la Deuda para 50% de Financiación

Sistema amortizacion:	Cuota Fija				
Deuda	\$28,089,831				
Tasa interés (EA)	19.56%				
Plazo	8				
Cuota fija:	\$7,224,720.26				
	Saldo inicial	Cuota	Interes	Abono Capital	Saldo Final
					\$28,089,831.00
1	\$28,089,831.00	\$7,224,720.26	\$5,494,370.94	\$1,730,349.31	\$26,359,481.69
2	\$26,359,481.69	\$7,224,720.26	\$5,155,914.62	\$2,068,805.64	\$24,290,676.05
3	\$24,290,676.05	\$7,224,720.26	\$4,751,256.24	\$2,473,464.02	\$21,817,212.03
4	\$21,817,212.03	\$7,224,720.26	\$4,267,446.67	\$2,957,273.58	\$18,859,938.44
5	\$18,859,938.44	\$7,224,720.26	\$3,689,003.96	\$3,535,716.30	\$15,324,222.15
6	\$15,324,222.15	\$7,224,720.26	\$2,997,417.85	\$4,227,302.40	\$11,096,919.74
7	\$11,096,919.74	\$7,224,720.26	\$2,170,557.50	\$5,054,162.75	\$6,042,756.99
8	\$6,042,756.99	\$7,224,720.26	\$1,181,963.27	\$6,042,756.99	\$0.00

Tabla Indicadores de Rentabilidad 50% de Financiación

VPN (Ko')	-\$4,758,863.3
VPN (Precio Constante)	-\$34,016.5
TIR	10.1%

Proyecto con 60% de Financiación

Tabla Flujo de Efectivo para 60% de Financiación

FLUJO DE CAJA DEL PROYECTO CON FINANCIACION									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Ventas proyectadas		\$38,617,000	\$40,547,850	\$42,575,243	\$44,704,005	\$46,939,205	\$49,286,165	\$51,750,473	\$54,337,997
Costos Operación		\$10,330,000	\$10,846,500	\$11,388,825	\$11,958,266	\$12,556,180	\$13,183,989	\$13,843,188	\$14,535,347
Costos Materia Prima		\$17,343,606	\$18,210,787	\$19,121,326	\$20,077,392	\$21,081,262	\$22,135,325	\$23,242,091	\$24,404,196
Depreciación		\$6,109,958	\$6,109,958	\$6,109,958	\$6,109,958	\$6,109,958	\$6,109,958	\$6,109,958	\$6,109,958
Amortización		\$705,000	\$705,000	\$705,000	\$705,000	\$705,000	\$705,000	\$705,000	\$705,000
Utilidad Operativa		\$4,128,436	\$4,675,605	\$5,250,134	\$5,853,388	\$6,486,806	\$7,151,894	\$7,850,236	\$8,583,496
Intereses		\$6,593,245	\$6,187,098	\$5,701,507	\$5,120,936	\$4,426,805	\$3,596,901	\$2,604,669	\$1,418,356
Utilidad antes de impuestos		-\$2,464,809	-\$1,511,492	-\$451,374	\$732,452	\$2,060,001	\$3,554,992	\$5,245,567	\$7,165,140
Impuestos		\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0
Utilidad Operativa despues de impuestos		-\$2,464,809	-\$1,511,492	-\$451,374	\$732,452	\$2,060,001	\$3,554,992	\$5,245,567	\$7,165,140
Préstamo	\$33,707,797								
Depreciación		\$6,109,958	\$6,109,958	\$6,109,958	\$6,109,958	\$6,109,958	\$6,109,958	\$6,109,958	\$6,109,958
Amortización		\$705,000	\$705,000	\$705,000	\$705,000	\$705,000	\$705,000	\$705,000	\$705,000
Amortización Capital		\$2,076,419	\$2,482,567	\$2,968,157	\$3,548,728	\$4,242,860	\$5,072,763	\$6,064,995	\$7,251,308
Inversion incremental en capital de trabajo		\$0	\$250,000	\$262,500	\$275,625	\$289,406	\$303,877	\$319,070	\$335,024
Inversión Inicial	\$51,179,662								
Capital de trabajo	\$5,000,000								
Total Inversion + Capital	\$56,179,662								
Flujo de Caja Neto	-\$22,471,865	\$2,273,729	\$2,570,899	\$3,132,927	\$3,723,057	\$4,342,693	\$4,993,311	\$5,676,459	\$6,393,765

Tabla Pago de la Deuda para 60% de Financiación

Sistema amortizacion:	Cuota Fija				
Deuda	\$33,707,797				
Tasa interés (EA)	19.56%				
Plazo	8				
Cuota fija:	\$8,669,664.31				
	Saldo inicial	Cuota	Interes	Abono Capital	Saldo Final
					\$33,707,797.20
1	\$33,707,797.20	\$8,669,664.31	\$6,593,245.13	\$2,076,419.18	\$31,631,378.02
2	\$31,631,378.02	\$8,669,664.31	\$6,187,097.54	\$2,482,566.77	\$29,148,811.26
3	\$29,148,811.26	\$8,669,664.31	\$5,701,507.48	\$2,968,156.83	\$26,180,654.43
4	\$26,180,654.43	\$8,669,664.31	\$5,120,936.01	\$3,548,728.30	\$22,631,926.13
5	\$22,631,926.13	\$8,669,664.31	\$4,426,804.75	\$4,242,859.56	\$18,389,066.58
6	\$18,389,066.58	\$8,669,664.31	\$3,596,901.42	\$5,072,762.89	\$13,316,303.69
7	\$13,316,303.69	\$8,669,664.31	\$2,604,669.00	\$6,064,995.31	\$7,251,308.39
8	\$7,251,308.39	\$8,669,664.31	\$1,418,355.92	\$7,251,308.39	\$0.00

Tabla Indicadores de Rentabilidad 60% de Financiación

VPN (Ko')	-\$5,017,182.5
VPN (Precio Constante)	-\$1,342,133.4
TIR	7.9%

Proyecto con 100% de Financiación

Tabla Flujo de Efectivo para 100% de Financiación

FLUJO DE CAJA DEL PROYECTO CON FINANCIACION									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Ventas proyectadas		\$38,617,000	\$40,547,850	\$42,575,243	\$44,704,005	\$46,939,205	\$49,286,165	\$51,750,473	\$54,337,997
Costos Operación		\$10,330,000	\$10,846,500	\$11,388,825	\$11,958,266	\$12,556,180	\$13,183,989	\$13,843,188	\$14,535,347
Costos Materia Prima		\$17,343,606	\$18,210,787	\$19,121,326	\$20,077,392	\$21,081,262	\$22,135,325	\$23,242,091	\$24,404,196
Depreciación		\$6,109,958	\$6,109,958	\$6,109,958	\$6,109,958	\$6,109,958	\$6,109,958	\$6,109,958	\$6,109,958
Amortización		\$705,000	\$705,000	\$705,000	\$705,000	\$705,000	\$705,000	\$705,000	\$705,000
Utilidad Operativa		\$4,128,436	\$4,675,605	\$5,250,134	\$5,853,388	\$6,486,806	\$7,151,894	\$7,850,236	\$8,583,496
Intereses		\$10,988,742	\$10,311,829	\$9,502,512	\$8,534,893	\$7,378,008	\$5,994,836	\$4,341,115	\$2,363,927
Utilidad antes de impuestos		-\$6,860,306	-\$5,636,224	-\$4,252,379	-\$2,681,505	-\$891,202	\$1,157,058	\$3,509,121	\$6,219,569
Impuestos		\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0
Utilidad Operativa despues de impuestos		-\$6,860,306	-\$5,636,224	-\$4,252,379	-\$2,681,505	-\$891,202	\$1,157,058	\$3,509,121	\$6,219,569
Préstamo	\$56,179,662								
Depreciación		\$6,109,958	\$6,109,958	\$6,109,958	\$6,109,958	\$6,109,958	\$6,109,958	\$6,109,958	\$6,109,958
Amortización		\$705,000	\$705,000	\$705,000	\$705,000	\$705,000	\$705,000	\$705,000	\$705,000
Amortización Capital		\$3,460,699	\$4,137,611	\$4,946,928	\$5,914,547	\$7,071,433	\$8,454,605	\$10,108,326	\$12,085,514
Inversion incremental en capital de trabajo		\$0	\$250,000	\$262,500	\$275,625	\$289,406	\$303,877	\$319,070	\$335,024
Inversión Inicial	\$51,179,662								
Capital de trabajo	\$5,000,000								
Total Inversion + Capital	\$56,179,662								
Flujo de Caja Neto	\$0	-\$3,506,047	-\$3,208,877	-\$2,646,849	-\$2,056,720	-\$1,437,084	-\$786,466	-\$103,317	\$613,989

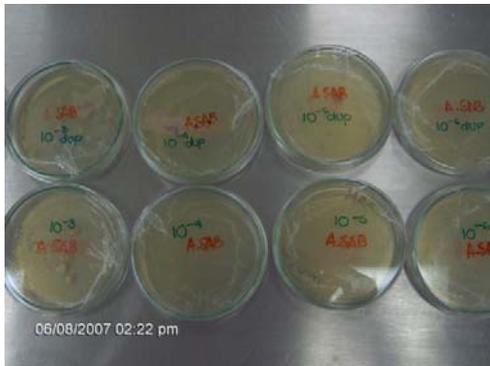
Tabla Pago de la Deuda para 100% de Financiación

Sistema amortización:	Cuota Fija				
Deuda	\$56,179,662				
Tasa interés (EA)	19.56%				
Plazo	8				
Cuota fija:	\$14,449,440.51				
	Saldo inicial	Cuota	Interes	Abono Capital	Saldo Final
					\$56,179,662.00
1	\$56,179,662.00	\$14,449,440.51	\$10,988,741.89	\$3,460,698.63	\$52,718,963.37
2	\$52,718,963.37	\$14,449,440.51	\$10,311,829.24	\$4,137,611.28	\$48,581,352.10
3	\$48,581,352.10	\$14,449,440.51	\$9,502,512.47	\$4,946,928.04	\$43,634,424.06
4	\$43,634,424.06	\$14,449,440.51	\$8,534,893.35	\$5,914,547.17	\$37,719,876.89
5	\$37,719,876.89	\$14,449,440.51	\$7,378,007.92	\$7,071,432.59	\$30,648,444.30
6	\$30,648,444.30	\$14,449,440.51	\$5,994,835.70	\$8,454,604.81	\$22,193,839.49
7	\$22,193,839.49	\$14,449,440.51	\$4,341,115.00	\$10,108,325.51	\$12,085,513.98
8	\$12,085,513.98	\$14,449,440.51	\$2,363,926.53	\$12,085,513.98	\$0.00

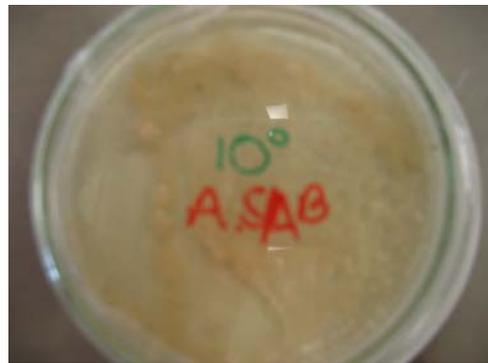
Tabla Indicadores de Rentabilidad 100% de Financiación

VPN (Ko')	-\$8,824,394.7
VPN (Precio Constante)	-\$10,444,488.4
TIR	0.0%

Anexo IX. Fotografías



Siembra con Dilución Seriada



Crecimiento Microbiano



**Crecimiento en Líquido
(Adaptación)**



**Crecimiento en Sólido
(Aislamiento)**



Ensayos de Biodegradación



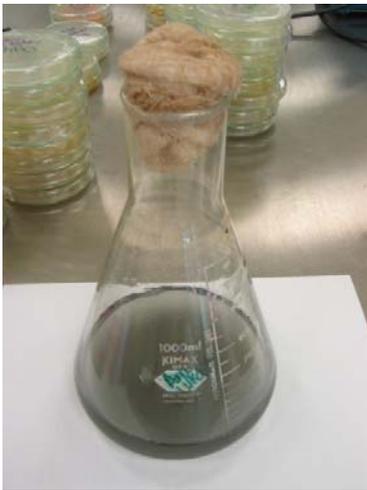
Degradación de Color



Siembra tipo Francés



Rhodotorula Rubra



Agua Residual Esterilizada