



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

**“EVALUACIÓN DE MICROORGANISMOS CAPACES DE
CRECER EN PRESENCIA DE TENSOACTIVOS AISLADOS A
PARTIR DE EFLUENTES DE LA PLANTA DE TRATAMIENTO
DE AGUAS RESIDUALES DEL CANTÓN PATATE”**

TRABAJO DE TITULACIÓN
TIPO: PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Presentado para optar por el grado académico de:
INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

AUTORA: JEIMY ESTEFANÍA PÉREZ PÉREZ

DIRECTOR: PhD. GERARDO EMILIO MEDINA RAMÍREZ

Riobamba – Ecuador

2019

©2019, Jeimy Estefanía Pérez Pérez

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

El Tribunal del trabajo de titulación certifica que: El trabajo de investigación: Tipo Proyecto de Investigación “EVALUACIÓN DE MICROORGANISMOS CAPACES DE CRECER EN PRESENCIA DE TENSOACTIVOS AISLADOS A PARTIR DE EFLUENTES DE LA PLANTA DE TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES DEL CANTÓN PATATE”, de responsabilidad de la señorita JEIMY ESTEFANÍA PÉREZ PÉREZ, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del trabajo de titulación, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

PhD. Gerardo Emilio Medina Ramírez

**DIRECTOR DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN**

PhD. Fausto Manolo Yaulema Garcés

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Jeimy Estefanía Pérez Pérez, declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y que los resultados del mismo son auténticos y originales. Los textos constantes en el documento que provienen de otra fuente están debidamente citados y referenciado. Como autora, asumo la responsabilidad legal y académicas de los contenidos de este trabajo de titulación.

Riobamba, 25 de Enero del 2019

Jeimy Estefanía Pérez Pérez

180497496-0

Yo, JEIMY ESTEFANÍA PÉREZ PÉREZ soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta Tesis y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo

Jeimy Estefanía Pérez Pérez

DEDICATORIA

A Dios y en especial a mi madre Rosa, por su esfuerzo y sacrificio, por darme la oportunidad de ser alguien en la vida, por brindarme su apoyo incondicional en cada etapa de mi carrera, por tenerme paciencia y apoyarme en los buenos y malos momentos y nunca desampararme.

Jeimy Estefanía

AGRADECIMIENTO

Al Gobierno Autónomo Descentralizado del Cantón Patate en especial al Ing. Geovanny Soria por abrirme sus puertas y permitir la apertura en el desarrollo de mi trabajo de investigación.

A la Dra. Elisabeth Escudero y al Dr. Freddy Lema por su colaboración en la donación de Tensoactivos utilizados en este trabajo.

A mi tutor el Dr. Gerardo Medina por su constante apoyo e imparcialidad de conocimientos y su guía en cada etapa de mi trabajo de titulación.

Jeimy Estefanía

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|--------------------|-----|
| RESUMEN..... | xx |
| SUMMARY..... | xxi |
| INTRODUCCIÓN | 1 |

CAPÍTULO I

| | |
|--|----|
| 1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL..... | 4 |
| 1.1. Antecedentes..... | 4 |
| 1.2. Marco conceptual | 5 |
| 1.2.1. Contaminación del Agua | 5 |
| 1.2.2. Microorganismos del Agua | 6 |
| 1.2.3. Microorganismos presentes en las aguas residuales | 6 |
| 1.2.4. Utilización de Bacterias en la eliminación de contaminantes | 7 |
| 1.2.5. Resistencia de microorganismos a contaminantes del ambiente. | 8 |
| 1.2.6. Técnica de Tinción de Gram | 8 |
| 1.2.7. Bacterias Gram Positivas..... | 9 |
| 1.2.8. Bacterias Gram Negativas. | 9 |
| 1.2.9. Contaminación de efluentes por Tensoactivos | 10 |
| 1.2.10. Tensoactivos o Surfactantes | 10 |
| 1.2.11. Producción mundial de Tensoactivos | 11 |
| 1.2.12. Tensoactivos aniónicos | 13 |
| 1.2.13. Tensoactivos catiónicos | 15 |
| 1.2.14. Tensoactivos no-iónicos..... | 16 |
| 1.2.15. Interacción entre microorganismos - tensoactivo | 17 |
| 1.2.16. Degradación microbiana de Tensoactivos | 17 |
| 1.2.17. Microorganismos productores de biosurfactantes..... | 20 |

CAPÍTULO II

| | | |
|----------------|---|-----------|
| 2. | MARCO METODOLÓGICO | 22 |
| 2.1. | Propósito de estudio..... | 22 |
| 2.2. | Lugar de recolección de muestras | 22 |
| 2.3. | Toma de la muestra | 22 |
| 2.4. | Medición de pH y temperatura | 25 |
| 2.5. | Preparación de medios | 26 |
| 2.6. | Aislamiento de la microbiota de las Aguas..... | 26 |
| 2.7. | Siembra..... | 26 |
| 2.8. | Estabilización de clones aislados | 26 |
| 2.9. | Reaislamiento y purificación de clones | 27 |
| 2.10. | Tinción Gram..... | 27 |
| 2.11. | Evaluación de la tolerancia de clones aislados a diferentes concentraciones de Tensoactivos. | 27 |
| 2.12. | Evaluación de clones aislados de MASL, MAC, MSPS frente a diferentes tensoactivos e hidrocarburos. | 28 |
| 2.13. | Cultivo de clones para la formación de halos de Inhibición. | 29 |
| 2.13.1. | Evaluación de clones en la formación de halos de Inhibición..... | 29 |
| 2.14. | Evaluación de la capacidad de crecimiento de clones seleccionados, utilizando como única fuente de carbono los tensoactivos seleccionados y petróleo. | 29 |

CAPÍTULO III

| | | |
|---------------|--|-----------|
| 3. | MARCO DE RESULTADOS, DISCUSION Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.. | 31 |
| 3.1 | Evaluación de la microbiota presente en las muestras del agua residual de la Planta de Tratamiento..... | 31 |
| 3.1.1. | <i>Determinación del crecimiento microbiano en medio MASL 100 ppm.</i> | 31 |
| 3.1.2. | <i>Determinación del crecimiento microbiano en medio MAC 50 ppm.</i> | 33 |
| 3.1.3. | <i>Determinación del crecimiento microbiano en medio sin presión selectiva MSPS.</i> | 35 |
| 3.1.4. | <i>Determinación del crecimiento microbiano por mililitro de cada muestra en medio MASL, MAC y MSPS.</i> | 37 |

| | | |
|--------|---|----|
| 3.2. | Evaluación microscópica y tinción de Gram de los aislados bacterianos seleccionados. | 38 |
| 3.2.1. | <i>Resultados de la Tinción de Gram de los clones aislados en medio MASL.</i> | 38 |
| 3.2.2. | <i>Resultados de la Tinción de Gram de los clones aislados de medio MAC.</i> | 39 |
| 3.2.3. | <i>Evaluación de Bacterias Gram Positivas y Bacterias Gram Negativas de clones aislados de medio MSPS.</i> | 40 |
| 3.3. | Determinación de la tolerancia de clones aislados a diferentes concentraciones de Tensoactivos | 41 |
| 3.3.1. | <i>Evaluación de la Tolerancia de clones aislados del medio suplementado con Ácido sulfónico lineal a diferentes concentraciones de ASL.</i> | 42 |
| 3.3.2. | <i>Evaluación de la Tolerancia de clones aislados del medio suplementado con Amonio Cuaternario a diferentes concentraciones de AC.</i> | 45 |
| 3.3.3. | <i>Evaluación de la Tolerancia de clones aislados del medio MASL, MAC y MSPS a diferentes concentraciones de Nonil Fenol 9 moles.</i> | 48 |
| 3.4. | Determinación del comportamiento de los diferentes clones aislados del medio MASL, MAC y MSPS frente a Amonio Cuaternario 500 ppm, Lauril sulfonato de sodio 500 ppm y sin presión selectiva. | 51 |
| 3.4.1. | <i>Evaluación del comportamiento de los clones aislados utilizando Acido Sulfónico Lineal frente a AC 500 ppm, LSS 500 ppm y sin presión selectiva.</i> | 51 |
| 3.4.2. | <i>Evaluación del comportamiento de los clones aislados a partir de medio MAC frente a ASL 1000 ppm, LSS y sin presión selectiva.</i> | 54 |
| 3.4.3. | <i>Evaluación del comportamiento de los clones aislados del medio sin presión selectiva frente a AC 500 ppm, LSS 500 ppm y ASL 1000 ppm.</i> | 58 |
| 3.5. | Determinación del comportamiento de los diferentes clones aislados de medios suplementados con Ácido sulfónico lineal, Amonio Cuaternario y sin presión selectiva frente a Petróleo 1000 µL/100mL. | 61 |
| 3.5.1. | <i>Evaluación del comportamiento de los clones aislados del medio MASL frente a Petróleo 1000 µL/100mL.</i> | 61 |
| 3.5.2. | <i>Evaluación del comportamiento de los clones aislados del medio MAC frente a Petróleo 1000 µL/100mL.</i> | 64 |
| 3.5.3. | <i>Evaluación del comportamiento de los clones aislados a partir del medio sin presión selectiva MSPS frente a Petróleo 1000 µL/100mL.</i> | 65 |

| | | |
|-------------|--|-----------|
| 3.6. | Evaluación de la producción de sustancias inhibitorias del crecimiento bacteriano en los clones aislados a partir de los medios MASL, MAC y MSPS frente Clon 6, Clon 29 y <i>E. coli</i>. | 68 |
| 3.7. | Evaluación de la capacidad del crecimiento en medio mineral Agar Bushnell Haas (Medio mínimo) suplementado con ASL 1050ppm, AC 500ppm y P 1000μL/100mL de clones aislados de los medios MASL, MAC y MSPS. | 69 |
| | CONCLUSIONES | 74 |
| | RECOMENDACIONES | 76 |
| | BIBLIOGRAFÍA | |
| | ANEXOS | |

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

| | |
|--------------|--|
| ASL | Ácido Sulfónico Lineal |
| AC | Amonio Cuaternario |
| LSS | Lauril Sulfonato de Sodio |
| NF | Nonil Fenol 9 moles |
| P | Petróleo |
| MASL | Medio Suplementado con Ácido Sulfónico Lineal |
| MAC | Medio Suplementado con Amonio Cuaternario |
| MLSS | Medio Suplementado con Lauril Sulfonato de Sodio |
| MNF | Medio Suplementado con Nonil Fenol 9 moles |
| MP | Medio Suplementado con Petróleo |
| MM | Medio Mínimo |
| MMASL | Medio Mínimo Suplementado con Ácido Sulfónico Lineal |
| MMAC | Medio Mínimo Suplementado con Amonio Cuaternario |
| MMP | Medio Mínimo Suplementado con Petróleo |
| ppm | Partes por millón |
| mL | Mililitro |
| μL | Microlitros |

ÍNDICE DE TABLAS

| | | |
|--------------------|--|----|
| Tabla 1-1: | Ejemplos de los principales tipos de tensoactivos de acuerdo a su carga. | 13 |
| Tabla 2-1: | Especien de microorganismos productores de biosurfactantes en el ambiente. . | 21 |
| Tabla 1-2: | Composición de medio de cultivo para selección de microorganismos tolerantes a Tensoactivos. | 26 |
| Tabla 2-2: | Concentración creciente de Tensoactivos para la selección de microorganismos tolerantes. | 28 |
| Tabla 3-2: | Concentración de Tensoactivos e Hidrocarburos para selección de microorganismos tolerantes..... | 28 |
| Tabla 4-2: | Composición del medio mineral Agar Bushnell Haas (Medio mínimo) utilizado para la selección de clones capaces de crecer utilizando los Tensoactivos o Petróleo como nutrientes. | 29 |
| Tabla 1-3: | Recuento microbiológico por mililitro de la Muestra 1 inoculada en medio MASL 100 ppm..... | 31 |
| Tabla 2-3: | Recuento microbiológico por mililitro de la Muestra 2 inoculada en medio MASL 100 ppm..... | 31 |
| Tabla 3-3: | Recuento microbiológico por mililitro de la Muestra 3 inoculada en medio MASL 100 ppm..... | 32 |
| Tabla 4-3: | Recuento microbiológico por mililitro de la Muestra 4 inoculada en medio MASL 100 ppm..... | 32 |
| Tabla 5-3: | Recuento microbiológico por mililitro de la Muestra 1 inoculada en medio MAC 50 ppm..... | 33 |
| Tabla 6-3: | Recuento microbiológico por mililitro de la Muestra 2 inoculada en medio MAC 50 ppm..... | 33 |
| Tabla 7-3: | Recuento microbiológico por mililitro de la Muestra 3 inoculada en medio MAC 50 ppm..... | 34 |
| Tabla 8-3: | Recuento microbiológico por mililitro de la Muestra 4 inoculada en medio MAC 50 ppm..... | 34 |
| Tabla 9-3: | Recuento microbiológico por mililitro de la Muestra 1 inoculada en medio MSPS..... | 35 |
| Tabla 10-3: | Recuento microbiológico por mililitro de la Muestra 2 inoculada en medio MSPS..... | 36 |
| Tabla 11-3: | Recuento microbiológico por mililitro de la Muestra 3 inoculada en medio MSPS..... | 36 |

| | | |
|--------------------|---|----|
| Tabla 12-3: | Recuento microbiológico por mililitro de la Muestra 4 inoculada en medio MSPS..... | 36 |
| Tabla 13-3: | Recuento microbiológico por mililitro de cada muestra de los medios MASL, MAC y MSPS..... | 37 |
| Tabla 14-3: | Resultados de la Tinción de Gram de los clones aislados del medio MASL | 38 |
| Tabla 15-3: | Resultados de la Tinción de Gram de los clones aislados del medio MAC. | 39 |
| Tabla 16-3: | Resultados de la Tinción de Gram de los clones aislados del medio MSPS | 40 |
| Tabla 17-3: | Evaluación de la formación de halos de inhibición por Clones aislados del medio MASL, MAC y MSPS..... | 68 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | | |
|--------------------|---|----|
| Figura 1-1: | Estructura de Tetrapropilbenceno sulfonato de sodio. | 4 |
| Figura 2-1: | Estructura molecular de Dodecilbenceno sulfonato de sodio lineal. | 11 |
| Figura 3-1: | Molécula del Tensoactivo en la interface. | 11 |
| Figura 4-1: | Consumo de tensoactivos en el mundo durante el año 2006 | 12 |
| Figura 5-1: | Ácido Sulfónico Estructura química | 14 |
| Figura 6-1: | Estructura química de Lauril Sulfato de Sodio. | 15 |
| Figura 7-1: | Estructura química de Lauril Sulfato de Sodio. | 16 |
| Figura 8-1: | Etapas de la degradación biológica de un Tensoactivo. | 18 |
| Figura 9-1: | Diferentes rutas en la biodegradación de la Sal de Amonio Cuaternario. | 19 |
| Figura 1-2: | Zona de muestro, Planta de Tratamiento de Aguas Residuales | 22 |
| Figura 2-2: | Toma de muestra en el Canal de acceso y rejillas. | 23 |
| Figura 3-2: | Toma de muestra en el Lecho de secado. | 23 |
| Figura 4-2: | Toma de muestra en el Filtro Biológico. | 24 |
| Figura 5-2: | Toma de muestra en los Surcos trapezoidales. | 24 |
| Figura 6-2: | Toma de muestra en el Río Patate. | 25 |
| Figura 7-2: | Medición de temperatura en el sitio de muestreo. | 25 |

ÍNDICE DE GRÁFICOS

| | | |
|----------------------|--|----|
| Gráfico 1-3: | Efecto de ASL a diferentes concentraciones sobre el crecimiento de clones bacterianos aislados a partir de la Muestra 1..... | 42 |
| Gráfico 2-3: | Efecto de ASL a diferentes concentraciones sobre el crecimiento de clones bacterianos aislados a partir de la Muestra 2..... | 42 |
| Gráfico 3-3: | Efecto de ASL a diferentes concentraciones sobre el crecimiento de clones bacterianos aislados a partir de la Muestra 3..... | 43 |
| Gráfico 4-3: | Efecto de ASL a diferentes concentraciones sobre el crecimiento de clones bacterianos aislados a partir de la Muestra 4..... | 44 |
| Gráfico 5-3: | Efecto de AC a diferentes concentraciones sobre el crecimiento de clones bacterianos aislados a partir de la Muestra 1..... | 46 |
| Gráfico 6-3: | Efecto de AC a diferentes concentraciones sobre el crecimiento de clones bacterianos aislados a partir de la Muestra 2..... | 47 |
| Gráfico 7-3: | Efecto de AC a diferentes concentraciones sobre el crecimiento de clones bacterianos aislados a partir de la Muestra 3 y Muestra 4..... | 48 |
| Gráfico 8-3: | Efecto de NF a concentraciones de 500 y 2500 ppm sobre el crecimiento microbiano en clones aislados del medio MASL, MAC y MSPS, pertenecientes a la Muestra 1. | 49 |
| Gráfico 9-3: | Efecto de NF a concentraciones de 500 y 2500 ppm sobre el crecimiento microbiano en clones aislados del medio MASL y MAC, pertenecientes a la Muestra 2..... | 49 |
| Gráfico 10-3: | Efecto de NF a concentraciones de 500 y 2500 ppm sobre el crecimiento microbiano en clones aislados del medio MASL, MAC y MSPS, pertenecientes a la Muestra 3. | 50 |
| Gráfico 11-3: | Efecto de NF a concentraciones de 500 y 2500 ppm sobre el crecimiento microbiano en clones aislados del medio MASL, MAC y MSPS, pertenecientes a la Muestra 4. | 50 |
| Gráfico 12-3: | Crecimiento de los clones aislados de la Muestra 1 utilizando ASL como presión selectiva, en presencia de AC 500 ppm, LSS 500 ppm y sin tensoactivo (SPS)..... | 52 |
| Gráfico 13-3: | Crecimiento de los clones aislados de la Muestra 2 utilizando ASL como presión selectiva, en presencia de AC 500 ppm, LSS 500 ppm y control sin tensoactivo (SPS)..... | 52 |

| | |
|--|----|
| Gráfico 14-3: Crecimiento de los clones aislados de la Muestra 3 utilizando ASL como presión selectiva, en presencia de AC 500 ppm, LSS 500 ppm y control sin tensoactivo (SPS)..... | 53 |
| Gráfico 15-3: Crecimiento de los clones aislados de la Muestra 4 utilizando ASL como presión selectiva, en presencia de AC 500 ppm, LSS 500 ppm y control sin tensoactivo (SPS)..... | 53 |
| Gráfico 16-3: Crecimiento de los clones aislados de la Muestra 1 utilizando AC como presión selectiva, en presencia de ASL 1000 ppm, LSS 500 ppm y control sin tensoactivo (SPS)..... | 55 |
| Gráfico 17-3: Crecimiento de los clones aislados de la Muestra 2 utilizando AC como presión selectiva, en presencia de ASL 1000 ppm, LSS 500 ppm y control sin tensoactivo (SPS)..... | 56 |
| Gráfico 18-3: Crecimiento de los clones aislados de la Muestra 3 y Muestra 4 utilizando AC como presión selectiva, en presencia de ASL 1000 ppm, LSS 500 ppm y control sin tensoactivo (SPS)..... | 57 |
| Gráfico 19-3: Crecimiento de los clones aislados de la Muestra 1 utilizando medio sin presión selectiva, en presencia de, AC 500 ppm, LSS 500 ppm y ASL 1000 ppm. | 58 |
| Gráfico 20-3: Crecimiento de los clones aislados de la Muestra 2 utilizando medio sin presión selectiva, en presencia de, AC 500 ppm, LSS 500 ppm y ASL 1000 ppm. | 59 |
| Gráfico 21-3: Crecimiento de los clones aislados de la Muestra 3 utilizando medio sin presión selectiva, en presencia de, AC 500 ppm, LSS 500 ppm y ASL 1000 ppm. | 59 |
| Gráfico 22-3: Crecimiento de los clones aislados de la Muestra 4 utilizando medio sin presión selectiva, en presencia de AC 500 ppm, LSS 500 ppm y ASL 1000 ppm. | 60 |
| Gráfico 23-3: Crecimiento de los clones aislados de la Muestra 1 utilizando ASL como presión selectiva, en presencia de Petróleo 1000 μ L/100mL..... | 61 |
| Gráfico 24-3: Crecimiento de los clones aislados de la Muestra 2 utilizando ASL como presión selectiva, en presencia de Petróleo 1000 μ L/100mL..... | 62 |
| Gráfico 25-3: Crecimiento de los clones aislados de la Muestra 3 utilizando ASL como presión selectiva, en presencia de Petróleo 1000 μ L/100mL..... | 62 |
| Gráfico 26-3: Crecimiento de los clones aislados de la Muestra 4 utilizando ASL como presión selectiva, en presencia de Petróleo 1000 μ L/100mL..... | 63 |
| Gráfico 27-3: Crecimiento de los clones aislados de la Muestra 1 utilizando AC como presión selectiva, en presencia de Petróleo 1000 μ L/100mL..... | 64 |
| Gráfico 28-3: Crecimiento de los clones aislados de la Muestra 2 utilizando ASL como presión selectiva, en presencia de Petróleo 1000 μ L/100mL..... | 64 |

| | |
|--|----|
| Gráfico 29-3: Crecimiento de los clones aislados de la Muestra 3 y Muestra 4 utilizando ASL como presión selectiva, en presencia de Petróleo 1000 $\mu\text{L}/100\text{mL}$ | 65 |
| Gráfico 30-3: Crecimiento de los clones aislados de la Muestra 1 y utilizando un medio sin presión selectiva, en presencia de Petróleo 1000 $\mu\text{L}/100\text{mL}$ | 66 |
| Gráfico 31-3: Crecimiento de los clones aislados de la Muestra 2 y utilizando un medio sin presión selectiva, en presencia de Petróleo 1000 $\mu\text{L}/100\text{mL}$ | 66 |
| Gráfico 32-3: Crecimiento de los clones aislados de la Muestra 3 y utilizando un medio sin presión selectiva, en presencia de Petróleo 1000 $\mu\text{L}/100\text{mL}$ | 67 |
| Gráfico 33-3: Crecimiento de los clones aislados de la Muestra 4 y utilizando un medio sin presión selectiva, en presencia de Petróleo 1000 $\mu\text{L}/100\text{mL}$ | 67 |
| Gráfico 34-3: Evaluación del crecimiento de los clones aislados a partir de medios MASL, MAC y MSPS, procedentes de la Muestra 1 en Medio mínimo suplementado con AC 500 ppm, ASL 1050 ppm y Petróleo 1000 $\mu\text{L}/100\text{mL}$ | 69 |
| Gráfico 35-3: Evaluación del crecimiento de los clones aislados a partir de medios MASL, MAC, procedentes de la de la Muestra 2 en Medio mínimo suplementado con AC 500 ppm, ASL 1050 ppm y Petróleo 1000 $\mu\text{L}/100\text{mL}$ | 70 |
| Gráfico 36-3: Evaluación del crecimiento de los clones aislados a partir de medios MASL, MAC y MSPS, procedentes de la de la Muestra 3 en Medio mínimo suplementado con AC 500 ppm, ASL 1050 ppm y Petróleo 1000 $\mu\text{L}/100\text{mL}$ | 71 |
| Gráfico 37-3: Evaluación del crecimiento de los clones aislados a partir de medios MASL, MAC y MSPS, procedentes de la de la Muestra 4 en Medio mínimo suplementado con AC 500 ppm, ASL 1050 ppm y Petróleo 1000 $\mu\text{L}/100\text{mL}$ | 72 |

ÍNDICE DE ANEXOS

- ANEXO A** RESULTADOS ANALÍTICOS DE LAS AGUAS RESIDUALES DE LA PLANTA DE TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES DEL CANTÓN PATATE
- ANEXO B** TULSMA LIBRO VI, ANEXO 1 NORMAS DE DESCARGA DE EFLUENTES A UN CUERPO DE AGUA O RECEPTOR: AGUA DULCE Y AGUA MARINA

RESUMEN

De acuerdo a la concentración en la que se encuentren en el medio acuático, los tensoactivos son considerados tóxicos para los organismos, provocando contaminación en las aguas. El propósito de esta investigación fue evaluar la capacidad de tolerancia a tensoactivos de microorganismos aislados a partir de muestras de agua de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales del Cantón Patate. La selección de clones se realizó tomando en cuenta sus características morfológicas y su capacidad para crecer en medios suplementados con Ácido Sulfónico Lineal a una concentración inicial de 100 ppm y en medios suplementados con Amonio Cuaternario a una concentración inicial de 50 ppm utilizando como control el mismo medio sin presión selectiva. Los clones aislados fueron sometidos a una evaluación de la tolerancia al incremento de concentración de diferentes tensoactivos (Ácido sulfónico lineal y Amonio cuaternario). Los resultados obtenidos indicaron que los Clones 11 y 19 aislados del medio suplementado con Ácido sulfónico lineal fueron capaces de tolerar concentraciones de hasta 3500 ppm del tensoactivo y los Clones 11 y 19 aislados del medio suplementado con Amonio cuaternario fueron capaces de tolerar hasta concentraciones de 1500 ppm del tensoactivo. Posteriormente se evaluó el crecimiento de los clones en Agar Bushnell Haas utilizando como única fuente de carbono los tensoactivos. Los resultados mostraron que el Clon 11 aislado del medio suplementado con Amonio cuaternario, fue capaz de crecer a una concentración de 500 ppm y el Clon 27 aislado del medio suplementado con Ácido sulfónico lineal fue capaz de crecer a una concentración de 1050 ppm. Durante el estudio realizado se concluyó que el Amonio Cuaternario es el más tóxico, mientras que el Ácido Sulfónico Lineal mostro una menor toxicidad, luego de una mayor evaluación podrían ser utilizados como herramientas Biotecnológicas en procesos de Biorremediación (Tratamiento de aguas residuales).

Palabras clave: <BIOTECNOLOGÍA> <MICROBIOLOGÍA> <TENSOACTIVO>
<MICROORGANISMOS> <CRECIMIENTO MICROBIANO> <AGUA RESIDUAL>
<TOLERANCIA A TENSOACTIVOS>

SUMMARY

According to the concentration in which it is found in the aquatic environment, the surfactants are considered toxic for the organisms, causing pollution in the water. The purpose of this research is to evaluate the tolerance capacity to microorganisms' surfactants isolated from water samples from the Wastewater Treatment Plant of Patate Canton. The selection of clones has been made taking into account their morphological characteristics and their capacity to grow in supplemented media with Linear Sulfonic Acid at an initial concentration of 100 ppm and in supplemented media with Quaternary Ammonium at an initial concentration of 50 ppm, using as control the same medium without selective pressure. The isolated clones were subjected to an evaluation of tolerance to the increase of concentration of different surfactants (Linear Sulfonic Acid and Quaternary Ammonium). The results obtained indicated that Clones 11 and 19 isolated from the supplemented medium with Linear Sulfonic Acid were able to tolerate concentrations up to 3500 ppm of the surfactant and Clones 11 and 19 isolated from the supplemented medium with Quaternary Ammonium were able to tolerate concentrations of 1500 ppm of the surfactant. Subsequently the growth of clones in Bushell Hass Agar was evaluated using the surfactants as the only carbon source. The results showed that Clone 11 isolated from supplemented medium with Quaternary ammonium, was able to grow at a concentration of 500 ppm and Clone 27 isolated from the supplemented medium with Linear Sulfonic Acid was able to grow at a concentration of 1050 ppm. During the study, it was concluded that Quaternary Ammonium is the most toxic, while Linear Sulfonic Acid showed less toxicity, after further evaluation it could be used as Biotechnological tools in Bioremediation processes (Wastewater Treatment).

Key words: <BIOTECHNOLOGY> <MICROBIOLOGY> <SURFACTANT>
<MICROORGANISMS> <MICROBIAL GROWTH> <RESIDUAL WATER>
<TOLERANCE TO SURFACTANTS>.

INTRODUCCIÓN

Identificación del Problema

El Gobierno Autónomo Descentralizado Municipal San Cristóbal de Patate en el año 2013 con el propósito de minimizar el impacto ambiental que se produce en el río Patate por la incorporación a éste de las aguas residuales de la ciudad procedió a la construcción de una Planta de Tratamiento de aguas residuales (GAD Municipal San Cristobal de Patate, 2016, p. 56).

Estudios realizados por (GAD Municipal San Cristobal de Patate, 2016, p. 58) con el fin de comprobar el correcto funcionamiento de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales y para verificar el cumplimiento de los límites permisibles de descarga a cuerpos de agua dulce conforme al TULSMA, ver ANEXO A, demostraron que el parámetro tensoactivo no cumple con los límites permisibles establecidos (TULSMA, 2015, pp. 329,340)

La presencia de efluentes con tensoactivos son el resultado del uso de detergentes en las distintas actividades realizadas por el hombre, estos tensoactivos constituyen la materia activa de los detergentes y jabones los cuales constan de uno o varios grupos hidrófobos e hidrófilos cuyas características y tamaño permiten la disminución de la tensión superficial del agua (Aguirre, 2018, pp. 4,5).

Los tensoactivos acarrear serios problemas cuando son vertidos en cuerpos de agua ya que su remoción no es fácil y de acuerdo a su concentración representa un peligro potencial (Yépez, 2011, p. 5), por ejemplo en las plantas acuáticas genera la inhibición del proceso de la fotosíntesis ocasionando la muerte de la flora y a su vez de la fauna acuática, provocando lesiones en las branquias en los peces, dificultándoles la respiración y produciendo su muerte (AGUA, 2007, p. 4).

El estudio sobre la degradación biológica de los tensoactivos se torna de interés como consecuencia del desarrollo de una alta cantidad de productos que presentan en su composición. Investigaciones realizadas por Alayo (2013, p. 4) demuestran la capacidad degradativa de poblaciones microbianas mixtas como *Pseudomonas*, *Actinomyces*, *Bacillus*, *Staphylococcus* y *Corynebacterium* encontrados en ambientes contaminados por tensoactivos.

Formulación del Problema

¿Poseen los microorganismos aislados a partir de muestras de agua de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales del Cantón Patate capacidad de crecer en presencia de Tensoactivos?

Justificación

El aumento de la población en el Cantón Patate ha inducido que el agua, como recurso natural, tenga un inadecuado manejo en cuanto a su uso y a la incorporación de sustancias químicas contaminantes derivadas de actividades como la agricultura, actividades recreativas y domésticas.

El agua depurada en la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales del Cantón Patate ubicada en el sector Chilipata, incorpora permanente al Río Patate un caudal promedio de 5000 L/s, tomando como base estos datos, es significativo tener en cuenta los efectos que las aguas residuales y los contaminantes que éstas llevan producen sobre los seres vivos y el ambiente (GAD Municipal San Cristobal de Patate, 2016, p. 57).

El uso inadecuado y excesivo de detergentes, como bactericidas, blanqueadores, agentes espumantes, abrillantadores ópticos, entre otros, es una de las causas de contaminación del agua ya que cada uno provoca efectos negativos sobre los organismos y el ambiente. Los detergentes casi en su totalidad son persistentes y difíciles de degradar por la intervención de los microorganismos, éstos detergentes son llamados detergentes duros y los detergentes que son de fácil degradación son llamados detergentes blandos (AGUA, 2007, p. 2).

La degradación microbiana es considerada una de las alternativas amigables con el medio ambiente para eliminar los contaminantes que están presentes en distintos ecosistemas, ya que un gran número de microorganismos cuenta con el mecanismo enzimático, capacidad adaptativa y tolerancia para modificar los compuestos persistentes a compuestos más pequeños y menos tóxicos (Bueno, 2003, p. 7).

El presente trabajo de investigación está dirigido a aislar microorganismos a partir de muestras de agua obtenidas en la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales del Cantón Patate, sobre los cuales se realizara una evaluación de la capacidad de crecimiento sobre medios suplementados con tensoactivos, lo que implica un aspecto enmarcado dentro de las sublíneas de investigación institucional dentro de la cual se encuentra la Biotecnología, pertinente de la carrera de Ingeniería en Biotecnología Ambiental de la ESPOCH.

Objetivos

Objetivo General

- Evaluar la tolerancia a tensoactivos de microorganismos aislados a partir de muestras de agua de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales del Cantón Patate.

Objetivos Específicos

- Identificar las características físicas y químicas del agua residual proveniente de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales del Cantón Patate.
- Aislar y caracterizar clones microbianos presentes en muestras de agua colectadas de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales del Cantón Patate.
- Determinar la capacidad de crecimiento en presencia de Tensoactivos de los clones microbianos aislados.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

1.1. Antecedentes

En 1996, según un informe del Ministerio del Medio Ambiente de Colombia reportó una descarga de 1.800 toneladas de residuos de diferentes actividades domésticas y 500 toneladas derivadas de las actividades industriales en los diferentes ríos de Colombia, esto se debe principalmente a que la población no posee conciencia sobre la contaminación que se produce en el agua y solo un pequeño porcentaje de la población procedía a realizar algún tratamiento de las aguas residuales (Díaz, et al., 2002, pp. 56,57).

En la antigüedad, el jabón fue uno de los primeros detergentes en aparecer, pero debido a su baja eficiencia, en la Primera Guerra Mundial fueron sustituidos por los detergentes con tensoactivos sintéticos, su principal componente fue el tetrapropilbenceno sulfonato de sodio (Figura 1-1), que abasteció el 60% del requerimiento de tensoactivos a nivel mundial (Castro, 2000, pp. 22,23).

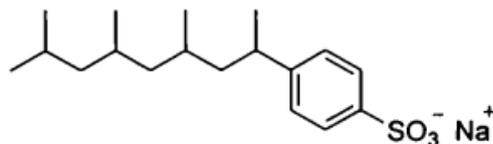


Figura 1-1: Estructura de Tetrapropilbenceno sulfonato de sodio.

Fuente: Castro, Mariano; 2000, p.5

En las últimas décadas debido a las diferentes actividades industriales y domésticas se han generado una gran variedad de efluentes contaminados con Tensoactivos, los cuales tienden a dificultar la oxigenación de los cuerpos de agua receptores afectando negativamente su flora y fauna, pudiendo incluso causar su muerte, lo que conduce a un aumento de nutrientes, en especial de N y P, provocando la eutrofización y un empobrecimiento de la vida acuática, generando de este modo un impacto negativo en los ecosistemas (Fortunato, et al., 1997, p. 4).

La necesidad del tratamiento de aguas residuales en los últimos años, debido a las características de los diferentes residuos presentes en ellas, han llevado al desarrollo de una serie de tratamientos biológicos, donde intervienen microorganismos tanto aerobios como anaerobios los cuales utilizan la materia orgánica de las aguas residuales como fuente de energía y carbono en su proceso metabólico (Tortora, et al., 2007, pp. 7,9)

Durante el tratamiento de las aguas residuales, un importante porcentaje de contaminantes tóxicos presentes en el agua residual pueden ser eliminados utilizando procesos de degradación biológica y adsorción en material particulado, mientras que los metabolitos de baja o nula toxicidad generados son dispersados en los diferentes compartimentos ambientales (Sibila, 2008, pp. 56-60).

En nuestros días al hablar de tensioactivos nos referimos, en principio, a un amplio espectro de compuestos, siendo los más importantes los: alquil benceno sulfonatos (LAB), los sulfatos éteres de alcoholes grasos (FAES), sulfatos de alcoholes grasos (FAS), alcoholes grasos etoxilados (FAEO) y los jabones, los cuales son utilizados para la elaboración de un sin número de productos, además de ser importantes contaminantes del agua (Aguilar, 2013, pp. 22-27).

1.2. Marco conceptual

1.2.1. Contaminación del Agua

El deterioro de la calidad del agua en mares, ríos y arroyos es consecuencia de la descarga directa de aguas contaminadas no tratadas a los efluentes, estas aguas residuales poseen grandes cantidades de compuestos químicos, sus efectos varían de acuerdo a los diferentes procesos del ámbito industrial, domestico, agrícola, pecuario o de cualquier otra actividad realizada por el hombre que resulta perjudicial y nociva para la vida acuática afectando los recursos naturales en general (Mencías & Mayero, 2000, pp. 200-205) (Ramos, et al., 2003, pp. 127-131).

Las aguas residuales que se encuentran estancadas pueden conllevar a la generación de malos olores debido a la descomposición de la materia orgánica que estas aguas contienen, además el agua residual contiene numerosos microorganismos patógenos procedentes de las heces humanas y animales que pueden causar enfermedades (Ramos, et al., 2003, p. 120).

1.2.2. Microorganismos del Agua

Las aguas dulces y saladas poseen un gran número de microorganismos que habitan en ellas de manera natural, sin embargo existen especies de bacterias, hongos, virus, protozoos que pueden ser perjudiciales para la salud humana, esto puede deberse a la descarga directa de las aguas residuales a los cuerpos de agua (Arcos, et al., 2005, pp. 4,5).

Entre los grupos más importantes presentes en el agua podemos mencionar a:

- Bacterias: Son microorganismo procariontes, unicelulares, su pared celular está constituida por hidratos de carbono y una glucoproteína llamada peptidoglucano, estos presentan reproducción por fisión binaria que consiste en la división de la célula en dos células iguales, poseen diferentes formas entre las que podemos mencionar los *bacilos* con forma de bastón y los *cocos* con forma esférica (Tortora, et al., 2007, p. 308).
- Protozoos: son microorganismos eucariontes, unicelulares, sin pared celular, su reproducción es asexualmente por división celular, presentan una morfología muy variada y habitan en lugares húmedos como lagos, ríos, mares, etc (Rodrigo, et al., 2010, p. 3).
- Virus: son microorganismos que presentan tamaños inferiores a las bacterias, poseen un solo tipo de ácido nucleico ARN o ADN, requieren de una célula viva para su reproducción, entre sus principales formas están las esféricas y espiral, estos microorganismos son más resistentes que las bacterias a muchos bactericidas (Molinao, s.f., p. 2).

1.2.3. Microorganismos presentes en las aguas residuales

En las aguas residuales existe una gran variedad de microorganismos como bacterias, hongos, levaduras, virus, protozoos, entre otros, estimándose la presencia de alrededor de cinco millones de microorganismos, la gran mayoría de estos microorganismos intervienen en la depuración de los efluentes por medio de la utilización de compuestos orgánicos presentes (Puruncajas, 2013, pp. 22-26).

Una parte de los microorganismos que se encuentran en las aguas residuales son dañinos, otros son benéficos por ejemplo aquellos microorganismos que realizan la biodegradación de materia orgánica contaminante, cuyo estudio es importante en procesos de biorremediación (Puruncajas, 2013, p. 32).

Entre los microorganismos presentes en las Aguas residuales tenemos:

- Bacterias: microorganismos abundantes en las aguas residuales, algunos pueden ser utilizados en el tratamiento de estas aguas, debido a que poseen la capacidad de estabilizar y degradar la materia orgánica.
- Protozoos: entre los protozoos que se encuentra con mayor frecuencia en las aguas residuales están las amebas, que juegan un papel importante en los procesos de tratamiento biológico.
- Hongos: al igual que las bacterias intervienen en el proceso de descomposición de la materia orgánica provenientes de las aguas residuales (Aguirre, 2018, pp. 3-7).

1.2.4. Utilización de Bacterias en la eliminación de contaminantes

Desde los años de 1988 investigadores han utilizado microorganismo para tratar diversos contaminantes tóxicos derivados de las actividades industriales, algunos microorganismos poseen la capacidad de utilizar los contaminantes como fuente de energía y otros microorganismos pueden producir enzimas con capacidad para transformar sustancias toxicas en menos complejas e inocuas. Estos microorganismos pueden ser autóctonos o pueden ser microorganismos genéticamente modificados (Tortora, et al., 2007, p. 506).

1.2.4.1. Bacterias

Ciertas bacterias poseen la capacidad de extraer o degradar contaminantes que se encuentran mezclados con suelo y agua, sin embargo cantidades pequeñas de poblaciones bacterianas son ineficaces en los procesos de eliminación de contaminantes a gran escala, por lo que algunos microorganismos son modificados mediante la manipulación genética para aumentar su eficiencia en la degradación de distintos contaminantes, entre las bacterias que se utilizan con mayor frecuencia en los procesos de descontaminación podemos mencionar a las de los genero *Pseudomonas* y *Bacillus* (Tortora, et al., 2007, pp. 502-510).

Una de las bacterias más utilizadas en el tratamiento de aguas residuales es el *Acinetobacter sp*: bacilo Gram negativo aerobio que utiliza los fosfatos que se encuentra en las aguas residuales en forma de polifosfatos para la síntesis de los componentes celulares. Si se encuentran en ambientes anaerobios, estas bacterias utilizan los ácidos grasos de las aguas residuales en forma de reserva (Puruncajas, 2013, pp. 320-324).

1.2.5. Resistencia de microorganismos a contaminantes del ambiente.

La resistencia bacteriana a elementos tóxicos puede ser adquirida por diversos mecanismos, entre los que se pueden mencionar las alteraciones genéticas inducidas por mutaciones o el intercambio genético entre bacterias mediado por diversos factores como los plásmidos y virus (Echevarria & Iglesias, 2003, pp. 2-5).

Un cierto número de bacterias desarrolla mecanismos de resistencia frente a factores tóxicos del ambiente, esto implica una serie de características que debe adoptar la bacteria para garantizar su supervivencia, por ejemplo:

Formación de biopelículas: Este mecanismo consiste en el crecimiento bacteriano asociado a un sustrato junto con la producción de una matriz extracelular la cual está constituida por proteínas, polisacáridos y ácidos nucleicos, la cual actúa como una barrera ante factores externos del ambiente, evitando por ejemplo los efectos negativos de los elementos tóxicos (Troncoso, et al., 2017, pp. 3,4).

1.2.6. Técnica de Tinción de Gram

La tinción de Gram es una técnica utilizada para clasificar en dos grandes grupos a las bacterias; Gram positivas y Gram negativas, esta técnica se basa en la composición química y las características en el contenido de peptidoglicano de la pared celular de las bacterias y cómo reaccionan frente a determinados colorantes, lo cual le otorga propiedades características a cada microorganismo (López, et al., 2014, pp. 2-4) (Tortora, et al., 2007, p. 420).

Esta técnica se basa en la utilización de colorantes, entre ellos el cristal violeta que tiene afinidad con el peptidoglucano en la pared celular de las bacterias tomando una coloración violeta tanto en las bacterias Gram negativas como Gram positivas (López, et al., 2014, p. 5).

El colorante lugol no permite la salida del cristal violeta debido a la formación de cristal violeta-yodo en la pared celular de la bacteria (Tortora, et al., 2007, p. 423).

La utilización de alcohol-acetona permite disolver la membrana externa en las bacterias Gram negativas creando orificios en la delgada capa de peptidoglucano liberando el cristal violeta-yodo tornándose incoloro en comparación a las bacterias Gram positivas que al contener mayor cantidad de capas de peptidoglucano, retienen una mayor cantidad este complejo (Tortora, et al., 2007, p. 424).

La safranina es el último colorante manipulado en esta técnica, se utiliza como un colorante secundario y sirve para teñir a las bacterias que no lograron contener el cristal violeta-yodo, adquiriendo un color rosado en las bacterias (López, et al., 2014, p. 6).

1.2.7. Bacterias Gram Positivas.

Un gran número de bacterias Gram positivas poseen en su pared celular diversas capas de peptidoglucano, estas glucoproteínas le confieren a la pared celular de las bacterianas una estructura gruesa y rígida en comparación a las bacterias Gram negativas que poseen en su pared celular una delgada capa de peptidoglucano (Tortora, et al., 2007, pp. 406-410).

La pared celular de las bacterias Gram positivas está compuestas entre otros compuestos, por ácidos teicoicos. Estos poseen una carga negativa por lo que se pueden unir a compuestos con carga positiva, estabilizando la pared celular y previniendo su ruptura, además son responsables de la especificidad antigénica en la pared celular (Tortora, et al., 2007, p. 405).

Los ácidos teicoicos se dividen en dos clases; el ácido lipoteicoico comprende toda la capa de peptidoglucano y se encuentra unido a la membrana plasmática y el ácido teicoico mutal que se encuentra unido a la capa de peptidoglucano (Tortora, et al., 2007, p. 406).

1.2.8. Bacterias Gram Negativas.

Las bacterias Gram negativas poseen una pared celular muy delgada en la que está ausente el ácido teicoico, con pocas capas de peptidoglucano, lo cual la hace vulnerable a la ruptura (Tortora, et al., 2007, p. 411) (Tafur, et al., 2008, p. 3).

La membrana externa que poseen las bacterias Gram negativas contiene una carga altamente negativa que dificulta la fagocitosis y la actividad del complemento, además actúa como una barrera frente a ciertos antibióticos, enzimas digestivas, detergentes y a metales pesados (Tortora, et al., 2007, p. 412) (Becerra, et al., 2009).

Sin embargo, la membrana externa de las bacterias Gram negativas no impiden el paso de otros compuestos del medio externo debido a que necesitan diversos nutrientes para su metabolismo, este proceso de transporte es realizado por unas proteínas denominadas porinas que forman canales en la membrana y permiten el paso selectivo de moléculas hidrófilas como disacáridos, aminoácidos, nucleótidos, péptidos, hierro y vitamina B₁₂, además ejercen una barrera frente a

antibióticos de alto peso molecular y no son vulnerables a la enzima lisozima que destruye el peptidoglicano en las bacterias (Tortora, et al., 2007, p. 412) (Mollinedo & Gonzáles, 2014, p. 2).

Uno de los componentes de la pared celular de las bacterias Gram negativas es la mureína (Peptidoglucano) la cual se encarga de suministrar dureza y forma a las bacterias (cocos, bacilos o espirilos), en el espacio periplasmático poseen una serie de enzimas hidrolíticas como por ejemplo lipasas, fosfatasas, nucleasas, proteasas y enzimas metabolizadoras de carbohidratos que son utilizadas para metabolizar y degradar macromoléculas (Mollinedo & Gonzáles, 2014, pp. 2-4).

1.2.9. Contaminación de efluentes por Tensoactivos

La contaminación del agua por tensoactivos se produce debido al aumento en el uso de detergentes en muchas de las actividades domestica e industriales realizadas por el hombre, constituyéndose una parte importante de los contaminantes presentes en las aguas residuales (Aguilar, 2013, p. 46).

Los tensoactivos aniónicos son unos de los principales causantes en el deterioro de la calidad del agua tanto superficial como subterránea, debido a que las concentraciones de los detergentes tienden a ser muy altas causando efectos negativos sobre los organismos presentes en ellas, por ejemplo en concentraciones de 50-60 ppm los tensoactivos provoca la inhibición de la flora nitrificante y a dosis de 120 ppm imposibilitan el desarrollo de las algas, esto puede afectar la biodegradación de otras sustancias que se encuentran en el agua reduciendo la capacidad de su autodepuración (Yépez, 2011, p. 11).

Para la degradación natural de los diferentes componentes que poseen los detergentes es necesario una demanda de oxígeno del medio hídrico, lo que puede provocar condiciones de anoxia, es decir la falta de oxígeno en el agua, además algunos componentes de los detergentes poseen efectos tóxicos en el metabolismo de los organismos acuáticos, lo cual puede conllevar a su muerte (Martínez, 2011, pp. 43-22).

1.2.10. Tensoactivos o Surfactantes

Los detergentes fueron reconocidos por presentar la capacidad de facilitar el lavado con agua, pero por los años de 1950 fueron remplazados casi en su totalidad por Tensoactivos, los más utilizados fueron el alquil benceno sulfonatos ramificados, los cuales resultaron ser muy contaminantes para el ambiente debido a que estos no se podían biodegradar fácilmente, estos

compuestos años después fueron sustituidos por los alquil benceno Sulfonatos lineales quienes mostraron mejor biodegradación en el ambiente (Lechuga, et al., 2012, p. 3).

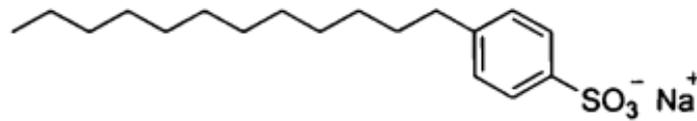


Figura 2-1: Estructura molecular de Dodecilbenceno sulfonato de sodio lineal.

Fuente: Castro, Mariano, 2000, p.8

Además de los surfactantes químicos también podemos encontrar a los biosurfactantes, ambos surfactantes poseen características tensoactivas, pero son diferentes en su estructura y en los métodos de ser producidos. Los biosurfactantes están constituidos por lípidos, azúcares y péptidos y pueden ser sintetizados por diferentes microorganismos (Martínez, 2011, p. 34).

Los tensoactivos o también llamados surfactantes son compuestos químicos y constituyentes esenciales de los detergentes, los cuales permiten la eliminación de la suciedad en los tejidos. Estos poseen una parte hidrofílica la cual interactúa con el agua y otra parte hidrofóbica que repele el agua, estas partes opuestas permiten extraer la suciedad de los tejidos (Chávez, et al., 2003, pp. 5-7)

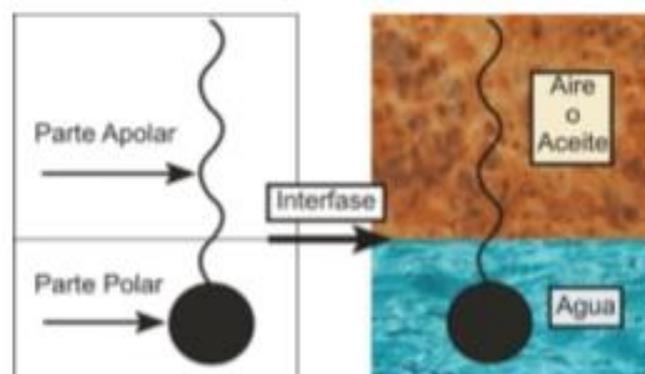


Figura 3-1: Molécula del Tensoactivo en la interface.

Fuente: Riojas, et al., 2010, p. 6

1.2.11. Producción mundial de Tensoactivos

La producción de tensoactivos en el mundo alcanza aproximadamente unos 12,5 millones de toneladas anualmente, de la cual los tensoactivos aniónicos constituyen alrededor del 55%, los tensoactivos no iónicos constituye el 40%, los tensoactivos cationicos representan el 4% y los tensoactivos anfóteros corresponden al 1% de la producción (Sibila, 2008, p. 63) .

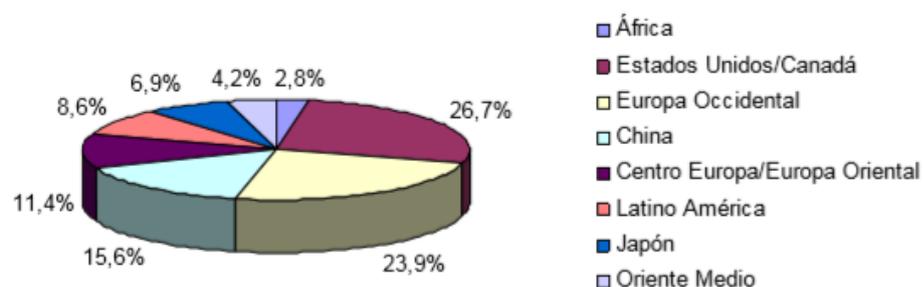


Figura 4-1: Consumo de tensoactivos en el mundo durante el año 2006

Fuente: Sibila, Miguel; 2008, p.32

Los tensoactivos aumentan la solubilidad en agua y la disponibilidad de compuestos orgánicos por lo que son utilizados en procesos de biorremediación de suelos y aguas que se encuentran contaminados con una alta cantidad de compuestos grasos difíciles de tratar, además los tensoactivos debido a sus propiedades son considerados en el ámbito biotecnológico para la remoción y biodegradación de muchos contaminantes (Becerra & Horna, 2016, pp. 2-6).

Los tensoactivos se clasifican en diferentes grupos dependiendo de su carga electrostática; tensoactivos aniónicos (carga negativa), catiónico (carga positiva), anfóteros (carga positiva o negativa) (Sibila, 2008, p. 68)

Tabla 1-1: Ejemplos de los principales tipos de tensoactivos de acuerdo a su carga.

| Clase | Nombre común | Acrónimo |
|-----------------------------|---|------------|
| Tensioactivos aniónicos | Lineal alquilbenceno sulfonatos | LAS |
| | Alcanos sulfonatos secundarios | SAS |
| | Alcoholes éter sulfatos (alquil etoxisulfatos) | AES |
| | Alcoholes sulfatos (alquil sulfatos) | AS |
| Tensioactivos No-iónicos | Alquilfenoles etoxilados | APE ó APEO |
| | Nonilfenoles etoxilados | NPE ó NPEO |
| | Octilfenoles etoxilados | OPE ó OPEO |
| | Alcoholes etoxilados | AE ó AEO |
| Tensioactivos catiónicos | Sales de amonio cuaternario | QAC |
| | Haluros de alquil trimetil amonio | TMAC |
| | Haluros de alquil dimetil amonio | DMAC |
| | Haluros de alquil bencil dimetil amonio | BDMAC |
| | Haluros de dialquil dimetil amonio | DADMAC |
| | Cloruro de bi(alquil grasa hidrogenada) dimetil amonio | DTDMAC |
| | Cloruro de bi(alquil grasa hidrogenada) trimetil amonio | DTTMAC |
| | Cloruro de dietil éster dimetil amonio | DEEDMAC |

Fuente: Sibila, Miguel; 2008, p.31

1.2.12. Tensioactivos aniónicos

Los tensoactivos aniónicos poseen carga eléctrica negativa y constan de 10 a 14 átomos de carbono en su cadena alquílica lineal o ramificada la cual posee en su extremo polar un anión, si su cadena es corta es considerado hidrosoluble pero si su cadena es muy grande presenta una baja hidrosolubilidad por lo que se presentan como aceites lubricantes en sistemas no acuosos, estos tensoactivos son los de mayor producción a escala industrial, debido a su efectividad y su bajo precio (Souza, et al., 2016, pp. 2-4)

Entre los tensoactivos aniónicos más utilizados podemos mencionar al alquil benceno sulfonato de sodio lineal (LAS), alquil benceno sulfonato de sodio ramificado (ABS) y sodio tripolifosfato (TPP), los cuales se pueden diferenciar por su estructura molecular, degradabilidad y toxicidad (Aguilar, 2013, p. 4).

El alquil benceno sulfonato de sodio ramificado posee una estructura molecular ramificada y presenta en los átomos de carbono terciarios anillos bencénicos por lo que tienen una escasa biodegradabilidad (Iannacone & Alvariño, 2002, pp. 4,5).

El alquil benceno sulfonato de sodio lineal posee una biodegradación mucho mayor en condiciones aeróbicas pero su biodegradación disminuye en condiciones anaerobias por lo que es considerado muchos más toxico (Campuzano, et al., 2006, pp. 2,3).

El Tripolifosfato de sodio es un coadyuvante inorgánico, utilizado para la disminución de la dureza del agua en explotaciones mineras y tratamiento de aguas, además de ser uno de los componentes en la producción de jabones y detergentes (Souza, et al., 2016, p. 2).

En la actualidad existen una variedad de sustitutos y coadyuvantes del tripolifosfato de sodio entre la que podemos mencionar las sales sódicas de ácidos hidroxicarboxílicos, zeolita sódica, carbonato sódico entre otros, los cuales se caracterizan por presentar una alta biodegradabilidad y bajos niveles de toxicidad (Sibila, 2008, p. 45).

1.2.12.1. Ácido Sulfónico Lineal.

Es considerado uno de los tensoactivos aniónicos más utilizado a nivel mundial, es soluble en agua, éter, alcohol y solventes orgánicos, además de ser totalmente biodegradable, éste tensoactivo es utilizado en la elaboración de detergentes de uso doméstico y de uso industrial. Es degradado aeróbicamente en un 99% por microorganismos y otros organismos acuáticos (Fernández, et al., 2014, pp. 239-241).

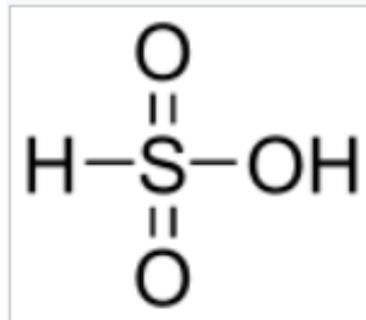


Figura 5-1: Ácido Sulfónico Estructura química

Fuente: Fernández, et al., 2014, p.56

Este tensoactivo al incrementarse la longitud de la cadena hidrocarbonada disminuye su biodegradabilidad por lo cual es considerado un problema ambiental, pudiendo generar efectos negativos sobre diferentes microorganismo como por ejemplo los hongos y diferentes bacterias reductoras de hierro y oxidadoras de amonio, también suelen tener efectos tóxicos en algunos vertebrados e invertebrados y plantas cuando aumenta su concentración (Sibila, 2008, p. 65).

1.2.12.2. Lauril Sulfato de Sodio

Es un tensoactivo aniónico conocido también como dodecil sulfato sódico (Figura 6-1), presenta características espumantes que es utilizado en la elaboración de shampoo, geles y cremas por sus propiedades emulsionantes y humectantes, además es un tensoactivo de fácil degradación y no es bioacumulable es decir que no permanece en el ambiente, aunque tienden a tener efectos tóxicos sobre organismos acuáticos según aumenta su concentración en los efluentes (Reese & Maguire, 1969, pp. 2,3).

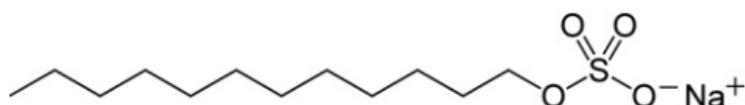


Figura 6-1: Estructura química de Lauril Sulfato de Sodio.

Fuente: Castro, Mariano; 2000, p.2

1.2.13. Tensoactivos catiónicos

Los tensoactivos catiónicos en su mayoría son del tipo amonio cuaternario, es decir compuestos nitrogenados, en solución acuosa presentan carga positiva la cual le permite atraer la mayoría de sustratos biológicos que se encuentran cargados negativamente (Ramos, et al., 2007, p. 2).

Los tensoactivos catiónicos en el transcurso del tratamiento de las aguas residuales son adsorbidos por el material particulado que se encuentra en las aguas, esto permite que las concentraciones en solución de estos tensoactivos disminuyan (Sibila, 2008, p. 34).

Los tensoactivos catiónicos poseen carga positiva lo que les permite interactuar con la membrana celular de los diferentes microorganismos existentes en el ambiente, lo cual les confiere propiedades bactericidas, además de ser inhibidores de corrosión (Ramos, et al., 2007, p. 3).

1.2.13.1. Amonio cuaternario

El amonio cuaternario es un compuesto nitrogenado, soluble en alcohol y agua además de ser considerado como un componente antimicrobiano (Alba & Araujo, 2008, p. 37).

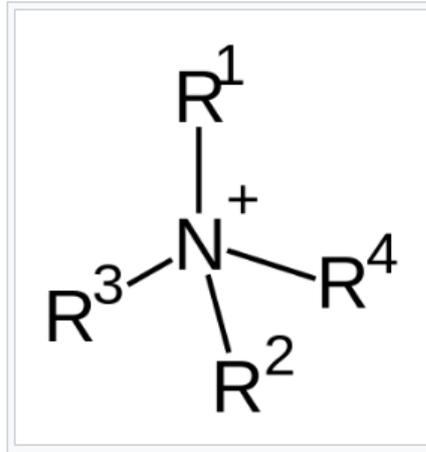


Figura 7-1: Estructura química de Lauril Sulfato de Sodio.

Fuente: Castro, Mariano; 2000, p. 4

Su efecto bactericida se debe a la interacción del compuesto con la membrana de la bacteria, ocasionando su rotura, degradándola e inactivando las proteínas (enzimas) (Alba & Araujo, 2008, pp. 34-45).

1.2.14. Tensoactivos no-iónicos

Estos tensoactivos no pueden ionizarse en soluciones acuosas, debido a que presentan en su parte hidrófila grupos del tipo fenol, alcohol, amida o éter, por tanto, no poseen una carga eléctrica definida, la mayoría de estos tensoactivos pueden volverse hidrofílicos debido a una cadena poliéter del tipo polióxido de etileno y en su parte hidrófobo presentan un alquil benceno o radical alquilo. Tienden a ser compatibles con tensoactivos aniónicos, así como con tensoactivos catiónicos, además de no ser afectados por los iones de magnesio y calcio del agua dura (Aguilar, 2013, pp. 2,3).

1.2.14.1. Nonil Fenol 9 moles

Este tensoactivo posee una estructura química en la cual un fenol se encuentra unido a una cadena de nueve átomos de carbono, es utilizado como detergente, dispersante, emulsificante y humectante en la industria textil y en la elaboración de detergentes de limpieza. Este tensoactivo presenta características tóxicas para la fauna acuática, su degradación biológica es lenta en agua y suelo, en organismos acuáticos y aves su bioacumulación tiende a ser significativa (Sibila, 2008, p. 49).

1.2.15. Interacción entre microorganismos - tensoactivo

La presencia de un tensoactivo en el ambiente debido a su toxicidad y su difícil degradación podría ser considerado como un evento de contaminación, por lo que es necesario tener en cuenta la peligrosidad de un tensoactivo al momento de elegirlo, por ejemplo, para la recuperación de un suelo (Bueno, 2003, p. 34).

Los tensoactivos reaccionan con las proteínas esenciales de los microorganismos impidiendo el funcionamiento normal de la célula bacteriana (Bueno, 2003, pp. 32-36).

Los tensoactivos de acuerdo al pH que adquieran en el ambiente pueden ser considerados como tóxicos, por ejemplo los tensoactivos aniónicos a pH ácidos son los más tóxicos para los microorganismos, los tensoactivos catiónico a pH neutro y pH básico son los más tóxicos y los tensoactivos no-iónicos por lo general son considerados menos tóxicos para los microorganismos en comparación a los tensoactivos iónicos (Bueno, 2003, p. 32).

En la biodegradación de algunos tensoactivos los productos puede ser más tóxicos que el compuesto inicial generando efectos negativos en el ambiente (Bueno, 2003, pp. 35-39).

1.2.16. Degradación microbiana de Tensoactivos

La degradación biológica de tensoactivos implica la utilización de diferentes especies de microorganismos en el tratamiento. Cabe destacar que estos tratamientos biológicos presentan extensos tiempos de tratamiento, requieren personal especializado, altos costos de inversión, entre otros (Reese & Maguire, 1969, p. 2).

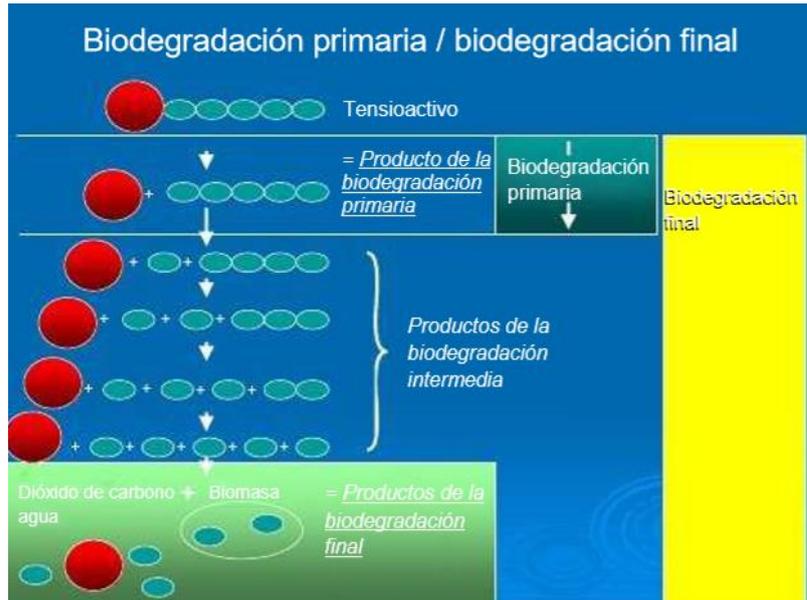


Figura 8-1: Etapas de la degradación biológica de un Tensoactivo.

Fuente: Yépez, Carol; 2011, p.5

La degradación biológica de los tensoactivos consta de tres etapas:

- Etapa primaria: en esta etapa ocurre la oxidación de la cadena, desulfuración y la ruptura del anillo aromático, por lo cual los tensoactivos pierden su capacidad de intervenir en la tensión superficial o capacidad de formar espuma.
- Etapa avanzada: las moléculas de los tensoactivos son transformadas en moléculas cada vez más pequeñas, por reacciones de oxidación.
- Etapa final: Finaliza con la ruptura del anillo bencénico del tensoactivo, transformándose en dióxido de carbono y agua como productos finales (Yépez, 2011, p. 45).

La mayor parte de los tensoactivos son biodegradables en condiciones aeróbicas, pero cabe destacar que los tensoactivos también pueden ser biodegradados en condiciones anaeróbicas, este proceso lo realizan microorganismos que se encuentran en el suelo y en los sedimentos (Alayo, et al., 2013, p. 3).

En el ambiente los tensoactivos de tipo alquil benceno sulfonato de sodio de cadena lineal presentan mejor degradación biológica en condiciones aeróbicas en comparación con ambientes anaeróbicos donde la degradación biológica es parcial. La interrelación entre las comunidades bacterianas beneficia la tolerancia a diversos factores ambientales como por ejemplo el pH y componentes orgánicos, aumentando su eficiencia en la transformación de alquil benceno sulfonato de sodio de cadena lineal, un grupo de bacterias atacan la cadena lateral mientras que otro grupo degrada la parte aromática de la cadena. (Alayo, et al., 2013, p. 3)

Algunas comunidades microbianas como por ejemplo *P. aeruginosa* poseen la capacidad de crecer en presencia de dodecibenceno sulfonato de cadena ramificada, alquilbenceno sulfonato de sodio de cadena lineal y alcohol citronfenol terpénico como única fuente de carbono, también se puede mencionar a *Corynebacterium*, *Actinomyces*, *Bacillus* y *Staphylococcus* con capacidad de tolerar altas concentraciones de tensoactivos. (Alayo, et al., 2013, p. 4)

Durante la degradación biológica de las sales de amonio cuaternario según Sibila, (2008, pp. 67,68,69) intervienen mecanismos de biodegradación como N-desalquilación, que consiste en el rompimiento del enlace C-N y N-desmetilaciones que consiste en continuas rupturas del enlace C-N del grupo metilo, además de no producir metabolitos recalcitrantes.

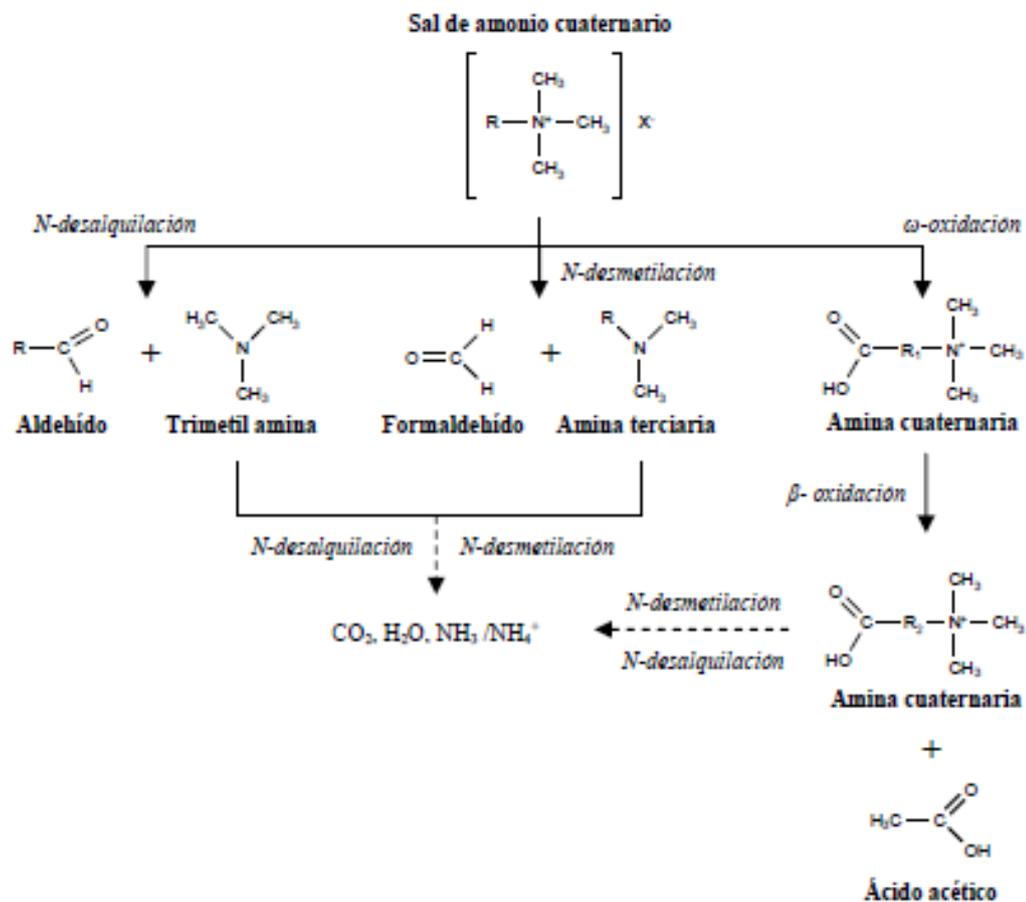


Figura 9-1: Diferentes rutas en la biodegradación de la Sal de Amonio Cuaternario.

Fuente: Sibila, Miguel: 2008, p. 67.

Con el fin de aprovechar los procesos de biotransformación y bioconversión llevados a cabo por los microorganismos, se han realizado procesos de manipulación para optimizar las diversas reacciones químicas que permitan la degradación y la transformación de contaminantes nocivos en elementos inofensivos y aprovechables (Campuzano, et al., 2006, pp. 3,4).

Los tensoactivos también son utilizados para la recuperación de suelos contaminados con hidrocarburos (PAHs) debido a que poseen la capacidad de aumentar la solubilidad y desorción en los hidrocarburos provocando que el contaminante se torne disponible para la acción de los microorganismos (Bueno, 2003, p. 54).

1.2.17. Microorganismos productores de biosurfactantes

Los biosurfactantes al igual que los tensoactivos pueden reducir la tensión superficial interfacial, estos biosurfactantes presentan interés debido a que en su utilización suelen ser de baja toxicidad y de mayor biodegradabilidad en comparación a los tensoactivos de industria química (Aguilar, 2013) (Becerra & Horna, 2016, pp. 4,5).

Los biosurfactantes son producidos a partir diversas fuentes como aceites vegetales, azúcares, hidratos de carbono, que son utilizados por una gran variedad de microorganismos que poseen la capacidad de producir biosurfactantes extracelulares o formando parte de la membrana celular en su etapa de crecimiento (Aguilar, 2013, pp. 53-56).

Los biosurfactantes en los microorganismos tienen como función mejorar la transferencia de diversos nutrientes a través de la membrana y proveer protección fungicida y biocida para el microorganismo productor del biosurfactante (Rosero, et al., 2001, p. 3).

De acuerdo a las numerosas investigaciones sobre los microorganismos capaces de producir biosurfactantes, se ha determinado que el tipo de biosurfactante depende de la especie de microorganismo que lo genera (Becerra & Horna, 2016, p. 4).

Tabla 2-1: Especien de microorganismos productores de biosurfactantes en el ambiente.

| Tipo de <u>biosurfactante</u> | Microorganismos |
|--|---|
| <u>Glicolipídios</u> | |
| • <u>ramnolipídios</u> | <u><i>Pseudomonas aeruginosa</i></u> |
| • <u>sorolipídios</u> | <u><i>Torulopsis bombicola</i>, <i>T. apícola</i></u> |
| • <u>Lípidos de trehalosa</u> | <u><i>Rhodococcus servthropolis</i></u> |
| <u>Lipopeptídicos e lipoproteínas</u> | <u><i>Mycobacterium sp.</i></u> |
| • <u>Viscosina</u> | <u><i>Pseudomonas fluorescens</i></u> |
| • <u>Serravetina</u> | <u><i>Serratia marcescens</i></u> |
| • <u>Subtilisina</u> | <u><i>Bacillus subtilis</i></u> |
| • <u>Surfactina</u> | <u><i>Bacillus subtilis</i></u> |
| • <u>Polimixina</u> | <u><i>Bacillus polymyxa</i></u> |
| <u>Fosfolípidos</u> | <u><i>Acinetobacter spp</i></u> |
| <u>Emulsificante de alimentos</u> | <u><i>Thiobacillus thiooxidans</i></u> |
| <u>Lípidos de Polioles</u> | <u><i>Candida utilis</i></u> |
| | <u><i>Rhodotorula glutinis</i></u> |
| <u>Antibióticos Tensoactivos</u> | <u><i>Rhodotorula graminis</i></u> |
| <u>Gramicidina</u> | <u><i>Brevibacterium brevis</i></u> |
| <u>Polimixinas</u> | <u><i>Bacillus polymyxa</i></u> |
| <u>Antibiótico TA</u> | <u><i>Mycococcus xanthus</i></u> |
| <u>Surfactantes poliméricos</u> | |
| • <u>Emulsan</u> | <u><i>Acinetobacter calcoaceticus</i></u> |
| • <u>Alasan</u> | <u><i>Acinetobacter radioresistens</i></u> |
| • <u>Liposan</u> | <u><i>Candida lipolytica</i></u> |
| • <u>Lipoproteínas de manano</u> | <u><i>Candida tropicalis</i></u> |
| <u>Surfactantes particulados</u> | |
| • <u>Vesículas</u> | <u><i>Acinetobacter calcoaceticus</i></u> |
| • <u>Células</u> | <u><i>Varias bacterias</i></u> |

Realizado por: Aguilar, Diana; 2013, p.18

Los biosurfactantes que son excretados al medio (extracelulares) poseen una estructura compleja de lípidos, carbohidratos y proteínas, cuya función es la de ayudar en la solubilización del sustrato a través de la membrana. Los biosurfactantes que permanecen incorporados a la pared celular (intracelular) poseen una estructura de lípidos y ayudan en la transferencia del sustrato insoluble a través de la membrana (Aguilar, 2013, p. 63).

La utilización de los diferentes biosurfactantes y enzimas específicas tales como las lipasas e hidrolasas, pueden ser de gran interés debido a que favorecen en el tratamiento biológico de zonas ambientales con un alto contenido de lípidos (Becerra & Horna, 2016, p. 4).

La utilización de biosurfactantes, producidos por *Arthrobacter*, *B. subtilis* y *Pseudomonas*, han demostrado ser efectivas en procesos de eliminación y transformación de alquitranes en suelos contaminados, además de presentar eficiencia en procesos de biorremediación de lugares contaminados con metales pesados (Aguilar, 2013, p. 57).

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1. Propósito de estudio

El presente trabajo de investigación tiene como propósito aislar microorganismos capaces de crecer en presencia de Tensoactivos a escala de laboratorio, con interés de que en un futuro puedan ser utilizados en Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales para disminuir la contaminación que se produce sobre los efluentes de agua dulce

2.2. Lugar de recolección de muestras

Las muestras de agua residual fueron tomadas en la Planta de tratamiento de Aguas Residuales del Cantón Patate ubicado en el sector de Chilipata.



Figura 1-2: Zona de muestreo, Planta de Tratamiento de Aguas Residuales

Realizado por: Pérez Jeimy; 2018

2.3. Toma de la muestra

Para la toma de muestra se utilizaron frascos de plástico estériles con capacidad de 100 mL, debidamente tapados y etiquetados. Se procedió a enjuagar los frascos tres veces con el agua que

se va a utilizar para luego tomar la muestra sin llenar completamente los frascos dejando un espacio de aire entre la tapa y el agua residual (Jover & García, 2004, pp. 242,243).

Las muestras fueron tomadas de los siguientes lugares:

- Sitio 1: Canal de acceso



Figura 2-2: Toma de muestra en el Canal de acceso y rejillas

Realizado por: Pérez Jeimy; 2018

- Sitio 2: Filtro biológico y lecho de secado



Figura 3-2: Toma de muestra en el Lecho de secado

Realizado por: Pérez Jeimy; 2018



Figura 4-2: Toma de muestra en el Filtro Biológico
Realizado por: Pérez Jeimy; 2018

- Sitio 3: Surcos trapezoidales



Figura 5-2: Toma de muestra en los Surcos trapezoidales
Realizado por: Pérez Jeimy; 2018

- Sitio 4: Incorporación de las aguas de la Planta de Tratamiento al Río Patate.



Figura 6-2: Toma de muestra en el Río Patate

Realizado por: Pérez Jeimy; 2018

Las muestras fueron trasladadas hasta el Laboratorio de Análisis Químicos y Bacteriológicos de la Facultad de Ciencias en la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

2.4. Medición de pH y temperatura

- Para la medición de pH se utilizaron tiras de papel indicadoras de pH en el lugar de la recolección de la muestra. Para ello se tomó una tira y se colocó en la muestra de agua para posteriormente comparar con la escala de color del indicador de pH (Jover & García, 2004, pp. 242,243).
- Para la medición de temperatura se utilizó un termómetro el cual se sumergió en el agua por un tiempo de 5 minutos y se observó la temperatura (Jover & García, 2004, p. 243)



Figura 7-2: Medición de temperatura en el sitio de muestreo.

Realizado por: Pérez Jeimy; 2018

2.5. Preparación de medios

Se prepararon el medio de cultivo (Standard Methods Agar) de acuerdo a las especificaciones del fabricante y se suplementó con los tensoactivos seleccionados ver Tabla 1-2.

Tabla 1-2: Composición de medio de cultivo para selección de microorganismos tolerantes a Tensoactivos.

| Medio de cultivo suplementado con Tensoactivos | | | |
|---|------------------------------|---------------|-------------|
| Medio de cultivo | Tensoactivo | Concentración | Abreviatura |
| Standard Methods Agar | Ácido Sulfónico lineal (ASL) | 100 ppm | MASL |
| Standard Methods Agar | Amonio Cuaternario (AC) | 50 ppm | MAC |
| Standard Methods Agar | Sin presión selectiva (SPS) | - | MSPS |

Realizado por: Pérez Jeimy; 2018

2.6. Aislamiento de la microbiota de las Aguas

Para reducir la concentración del número de bacterias en la muestra se procedió a realizar diluciones seriadas en tubos de ensayo estériles con agua estéril de acuerdo con las siguientes proporciones; 0,5mL (muestra) en 4,5mL (agua estéril), conteniendo el primer tubo de ensayo una dilución de 10^{-1} , el segundo tubo 10^{-2} , el tercer 10^{-3} , el cuarto 10^{-4} y el quinto tubo 10^{-5} , cabe destacar que cada tubo debe estar debidamente etiquetado con los datos correspondientes (Motamedi, et al., 2015, p. 95).

2.7. Siembra

De las diluciones 10^{-1} , 10^{-3} y 10^{-5} se tomaron 100 μ L y se procedió a la siembra con un asa de vidrio estéril sobre una placa con el medio de cultivo y se incubaron a una temperatura de 23°C hasta observar su crecimiento (Arroyave, et al., 2013, pp. 71-72).

Una vez observado su crecimiento se procedió a la selección de una población representativa de clones basándose en sus características morfológicas, por ejemplo, los que presentaron mejor crecimiento, forma, color, etc (Negroni, 2009, pp. 552,553).

2.8. Estabilización de clones aislados

Para la estabilización se procedió a repicar cada clon escogido en los medios de cultivo cada 24 horas, hasta un mínimo de tres repiques por clon, esto garantiza que el aislado sea capaz de crecer en el medio con los diferentes tensoactivos utilizados (Negroni, 2009, p. 553).

2.9. Reaislamiento y purificación de clones

El reaislamiento y purificación de clones se realizó mediante la técnica de aislamiento por agotamiento que consistió en utilizar un asa bacteriológica de platino esterilizada con la cual se tomó un inóculo de la muestra para transferirla a un espacio pequeño de otra placa formando estrías muy juntas sobre la placa, este proceso se realizó para cada clon escogido (Alarcón & Olivas, 2001, pp. 15,16).

2.10. Tinción Gram

Para la Tinción Gram se tomó un clon de MASL, MAC, MSPS respectivamente, con un asa bacteriológica de platino esterilizada y se extendió sobre un porta objeto con una gota de agua destilada a continuación se lo fijo al calor, seguidamente se le añadió los siguientes colorantes;

- Se añadió el colorante cristal violeta por 1 min, se enjuagó con abundante agua destilada hasta eliminar el exceso del colorante,
- Se añadió el colorante lugol por 1 min, se enjuagó con abundante agua destilada hasta eliminar el exceso del colorante
- Se añadió alcohol al 96% por 30 seg, se enjuagó con abundante agua destilada y
- Se añadió el colorante safranina por 1 min, se enjuagó con abundante agua destilada hasta eliminar el exceso del colorante y se dejó secar al aire.

Posteriormente se colocó una gota de aceite de inmersión sobre el clon sometido a la tinción para proceder a observarlo en el microscopio donde se los clasificó en Gram positivos y Gram negativos respectivamente (López, et al., 2014, pp. 2-8).

2.11. Evaluación de la tolerancia de clones aislados a diferentes concentraciones de Tensoactivos.

Se procedió a sembrar cada uno de los aislados bacterianos en concentraciones crecientes de los tensoactivos a evaluar cómo se indica en la Tabla 2-2.

Tabla 2-2: Concentración creciente de Tensoactivos para la selección de microorganismos tolerantes.

| Concentración de Tensoactivos | | |
|-------------------------------|----------|----------|
| Tensoactivo | ASL | AC |
| Concentración | 200 ppm | 100 ppm |
| | 300 ppm | 250 ppm |
| | 500 ppm | 500 ppm |
| | 1000 ppm | 750 ppm |
| | 2000 ppm | 1000 ppm |
| | 2500 ppm | 1500 ppm |
| | 3500 ppm | |

Realizado por: Pérez Jeimy; 2018

Para cada volumen de crecimiento que presenten los clones aislados en un periodo de tiempo se utilizó una escala de 1 para 1mm, 2 para 2mm, 3 para 3mm, 4 para 4mm y 5 para 5mm o más volumen de crecimiento.

2.12. Evaluación de clones aislados de MASL, MAC, MSPS frente a diferentes tensoactivos e hidrocarburos.

Para evaluar el comportamiento de los diferentes clones aislados frente a diferentes tensoactivos e hidrocarburos se procedió a sembrar cada uno de los clones bacterianos en los diferentes medios como se indica en la Tabla 3-2.

Tabla 3-2: Concentración de Tensoactivos e Hidrocarburos para selección de microorganismos tolerantes

| Concentración de Tensoactivos e Hidrocarburos | | | |
|---|-------------------------------|--------------------|-------------|
| Medio de cultivo | Tensoactivo | Concentración | Abreviatura |
| Standard Methods Agar | Lauril Sulfato de Sodio (LSS) | 500 ppm | MLSS |
| Standard Methods Agar | Nonil Fenol 9 moles (NF) | 500 ppm y 2500 ppm | MNF |
| Medio de cultivo | Hidrocarburo | Concentración | Abreviatura |
| Standard Methods Agar | Petróleo | 1000 µL/100mL | MP |

Realizado por: Pérez Jeimy; 2018

Al igual q el apartado anterior se evaluó el crecimiento de los diferentes clones aislados en una escala de 1-5 mm.

2.13. Cultivo de clones para la formación de halos de Inhibición.

Con el fin de determinar si los clones aislados producen alguna sustancia inhibidora del crecimiento bacteriano, se procedió al cultivo de clones para la formación de halos de inhibición, en el cual se utilizó tres clones: *Escherichia coli*, clon 29 seleccionado de AC y clon 6 seleccionado de un suelo contaminado con petróleo, cada clon se procedió a sembrar con una asa bacteriológica de platino esterilizada en caldo nutritivo y posteriormente se incubó a una temperatura para *E. coli* de 35°C y para los dos clones seleccionados de 23 °C por 24 horas (Arroyave, et al., 2013, p. 70).

2.13.1. Evaluación de clones en la formación de halos de Inhibición

Para la evaluación de formación de halos de inhibición se procedió a la distribución de cada clon previamente cultivado en caldo nutritivo con un hisopo estéril en una caja Petri con medio de cultivo, seguidamente se sembraron los clones aislados de MASL, MAC, MSPS y se incubó a una temperatura de 23°C hasta observar su crecimiento (Naheed & Jamil, 2015, p. 320).

2.14. Evaluación de la capacidad de crecimiento de clones seleccionados, utilizando como única fuente de carbono los tensoactivos seleccionados y petróleo.

Para evaluar la utilización de los elementos contaminantes (Tensoactivos y petróleo) por clones seleccionados, se utilizó el medio mineral Agar Bushnell Haas en el cual se le agregó Agar- Agar al 1,5 % y posteriormente fue suplementado con los tensoactivos seleccionados y petróleo a una concentración establecida, como se indica en la Tabla 4-2 (Forbes, 2009, pp. 215- 220).

Tabla 4-2: Composición del medio mineral Agar Bushnell Haas (Medio mínimo) utilizado para la selección de clones capaces de crecer utilizando los Tensoactivos o Petróleo como nutrientes.

| Agar Bushnell Haas | Tensoactivo | Concentración | Abreviatura |
|---|------------------------------|---------------|-------------|
| Sulfato de Magnesio 02g/L Cloruro de Calcio 0,02 g/L Fosfato Monobásico 1,0 g/L | Ácido Sulfónico lineal (ASL) | 1050 ppm | MMASL |
| | Amonio Cuaternario (AC) | 500 ppm | MMAC |
| Nitrato de Amonio 1,0 g/L Cloruro Férrico 0,05 g/L Agar- Agar 1,5 % | Hidrocarburo | Concentración | Abreviatura |
| | Petróleo | 1000 µL/100mL | MMP |

Realizado por: Pérez Jeimy; 2018

Posteriormente se procedió a sembrar los clones seleccionados a partir de los medios MASL, MAC, MSPS en el medio mínimo suplementado con los diferentes Tensoactivos e Hidrocarburo y se incubaron a una temperatura de 23°C hasta observar su crecimiento.

CAPÍTULO III

3. MARCO DE RESULTADOS, DISCUSION Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

3.1 Evaluación de la microbiota presente en las muestras del agua residual de la Planta de Tratamiento.

3.1.1. Determinación del crecimiento microbiano en medio MASL 100 ppm.

- (M1) Muestra 1

Tabla 1-3: Recuento microbiológico por mililitro de la Muestra 1 inoculada en medio MASL 100 ppm

| Unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro | | | | |
|---|----------|----------|----------|-------------|
| Tiempo (H) | 24 | 48 | 72 | UFC/1mL |
| M1 10 ⁻¹ A | Incontab | Incontab | Incontab | Incontab |
| M1 10 ⁻¹ B | Incontab | Incontab | Incontab | |
| M1 10 ⁻³ A | 473 | 560 | 560 | 27,000,000 |
| M1 10 ⁻³ B | 426 | 520 | 520 | |
| M1 10 ⁻⁵ A | 18 | 43 | 58 | 305,000,000 |
| M1 10 ⁻⁵ B | 27 | 53 | 64 | |
| Total (UFC/1mL) | | | | 166,000,000 |

Realizado por: Pérez Jeimy; 2018

- (M2) Muestra 2

Tabla 2-3: Recuento microbiológico por mililitro de la Muestra 2 inoculada en medio MASL 100 ppm.

| Unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro | | | | |
|---|----------|----------|----------|------------|
| Tiempo (H) | 24 | 48 | 72 | UFC/1mL |
| M2 10 ⁻¹ A | Incontab | Incontab | Incontab | Incontab |
| M2 10 ⁻¹ B | Incontab | Incontab | Incontab | |
| M2 10 ⁻³ A | 134 | 172 | 172 | 10,475,000 |
| M2 10 ⁻³ B | 202 | 247 | 247 | |
| M2 10 ⁻⁵ A | 0 | 1 | 1 | 17,500,000 |
| M2 10 ⁻⁵ B | 2 | 4 | 6 | |
| Total (UFC/1mL) | | | | 13,987,500 |

Realizado por: Pérez Jeimy; 2018

- **(M3) Muestra 3**

Tabla 3-3: Recuento microbiológico por mililitro de la Muestra 3 inoculada en medio MASL 100 ppm.

| Unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro | | | | |
|---|----------|----------|----------|-------------|
| Tiempo (H) | 24 | 48 | 72 | UFC/1mL |
| M3 10 ⁻¹ A | Incontab | Incontab | Incontab | Incontab |
| M3 10 ⁻¹ B | Incontab | Incontab | Incontab | |
| M3 10 ⁻³ A | 314 | 447 | 447 | 25,075,000 |
| M3 10 ⁻³ B | 422 | 556 | 556 | |
| M3 10 ⁻⁵ A | 15 | 26 | 49 | 235,000,000 |
| M3 10 ⁻⁵ B | 15 | 36 | 45 | |
| Total (UFC/1mL) | | | | 130,037,500 |

Realizado por: Pérez Jeimy; 2018

- **(M4) Muestra 4**

Tabla 4-3: Recuento microbiológico por mililitro de la Muestra 4 inoculada en medio MASL 100 ppm.

| Unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro | | | | |
|---|------|------|------|-----------|
| Tiempo (H) | 24 | 48 | 72 | UFC/1mL |
| M4 10 ⁻¹ A | 1448 | 1837 | 1837 | 859,250 |
| M4 10 ⁻¹ B | 1392 | 1600 | 1600 | |
| M4 10 ⁻³ A | 27 | 34 | 40 | 2,300,000 |
| M4 10 ⁻³ B | 39 | 46 | 52 | |
| M4 10 ⁻⁵ A | 0 | 0 | 0 | 0 |
| M4 10 ⁻⁵ B | 0 | 0 | 0 | |
| Total (UFC/1mL) | | | | 1,579,625 |

Realizado por: Pérez Jeimy; 2018

Los datos obtenidos evidencian que utilizando como presión selectiva el Ácido sulfónico lineal, la Muestra 1 que corresponde al agua que ingresa a la Planta de Tratamiento, fue la que presentó mayor carga microbiana, seguida por la Muestra 3 y la Muestra 2, en comparación con la Muestra 4 (Río Patate a la salida de la Planta), la cual presentó la menor carga microbiana, lo cual era de esperarse debido a la dilución inducida por el Río Patate.

Al comparar los resultados de crecimiento obtenidos en el medio suplementado con ASL (entre 1,5x10⁶ y 1,6x10⁸ UFC/mL), con los encontrados en el medio sin presión selectiva, donde osciló entre 5,9x10⁶ y 3,5x10⁸ UFC/mL, se evidencia que el Ácido Sulfónico Lineal presentó un efecto inhibitorio sobre el crecimiento microbiano.

Según Sánchez, María., (2007, p. 41), el efecto que produce el ácido sulfónico lineal sobre la microbiota del agua, se debe a la alteración que genera esta sustancia sobre la membrana celular del microorganismo, ocasionando su despolarización y como consecuencia generando la reducción de su capacidad para absorber nutrientes y oxígeno. De esta forma se puede considerar que a concentraciones a partir de 100 ppm de ASL, puede afectar negativamente a ciertos microorganismos en el agua.

3.1.2. Determinación del crecimiento microbiano en medio MAC 50 ppm.

- (M1) Muestra 1

Tabla 5-3: Recuento microbiológico por mililitro de la Muestra 1 inoculada en medio MAC 50 ppm.

| Unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro | | | | |
|---|----|-----|-----|---------|
| Tiempo (H) | 24 | 48 | 72 | UFC/1mL |
| M1 10 ⁻¹ A | 33 | 104 | 110 | 50,750 |
| M1 10 ⁻¹ B | 17 | 83 | 93 | |
| M1 10 ⁻³ A | 2 | 4 | 4 | 100,000 |
| M1 10 ⁻³ B | 0 | 0 | 0 | |
| M1 10 ⁻⁵ A | 0 | 0 | 0 | 0 |
| M1 10 ⁻⁵ B | 0 | 0 | 0 | |
| Total (UFC/1mL) | | | | 75,375 |

Realizado por: Pérez Jeimy; 2018

- (M2) Muestra 2

Tabla 6-3: Recuento microbiológico por mililitro de la Muestra 2 inoculada en medio MAC 50 ppm.

| Unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro | | | | |
|---|----|----|----|---------|
| Tiempo (H) | 24 | 48 | 72 | UFC/1mL |
| M2 10 ⁻¹ A | 13 | 31 | 34 | 23,750 |
| M2 10 ⁻¹ B | 19 | 57 | 61 | |
| M2 10 ⁻³ A | 0 | 0 | 0 | 0 |
| M2 10 ⁻³ B | 0 | 0 | 0 | |
| M2 10 ⁻⁵ A | 0 | 0 | 0 | 0 |
| M2 10 ⁻⁵ B | 0 | 0 | 0 | |
| Total (UFC/1mL) | | | | 23,750 |

Realizado por: Pérez Jeimy; 2018

- **(M3) Muestra 3**

Tabla 7-3: Recuento microbiológico por mililitro de la Muestra 3 inoculada en medio MAC 50 ppm.

| Unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro | | | | |
|---|----|----|-----|---------|
| Tiempo (H) | 24 | 48 | 72 | UFC/1mL |
| M3 10 ⁻¹ A | 14 | 81 | 88 | 51,250 |
| M3 10 ⁻¹ B | 15 | 99 | 117 | |
| M3 10 ⁻³ A | 0 | 0 | 0 | 0 |
| M3 10 ⁻³ B | 0 | 0 | 0 | |
| M3 10 ⁻⁵ A | 0 | 0 | 0 | 0 |
| M3 10 ⁻⁵ B | 0 | 0 | 0 | |
| Total (UFC/1mL) | | | | 51,250 |

Realizado por: Pérez Jeimy; 2018

- **(M4) Muestra 4**

Tabla 8-3: Recuento microbiológico por mililitro de la Muestra 4 inoculada en medio MAC 50 ppm.

| Unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro | | | | |
|---|----|----|----|---------|
| Tiempo (H) | 24 | 48 | 72 | UFC/1mL |
| M4 10 ⁻¹ A | 0 | 3 | 3 | 1,000 |
| M4 10 ⁻¹ B | 0 | 1 | 1 | |
| M4 10 ⁻³ A | 0 | 0 | 0 | 0 |
| M4 10 ⁻³ B | 0 | 0 | 0 | |
| M4 10 ⁻⁵ A | 0 | 0 | 0 | 0 |
| M4 10 ⁻⁵ B | 0 | 0 | 0 | |
| Total (UFC/1mL) | | | | 1,000 |

Realizado por: Pérez Jeimy; 2018

Los resultados del crecimiento bacteriano en presencia del AC indican que la Muestra 1 fue la que presentó mayor tolerancia, seguida por la Muestra 3 y la Muestra 2, en comparación con la Muestra 4 quien presentó la menor carga microbiana, estos resultados son similares a lo obtenido con el ASL, suponemos debido a la dilución inducida por el Rio Patate.

En el recuento microbiológico realizado a cada una las muestras en MAC 50 ppm se obtuvieron resultados de crecimiento bacteriano entre 1,000 y $7,5 \times 10^4$ UFC/1mL, estos datos son superiores a los datos reportados por Alba & Araujo, (2008, p. 59) en un muestreo de las areas y equipos de los Laboratorios Pronabell Ltda. De Colombia para evaluar la accion bactericida de TEGO 51

(Desinfectante líquido), el cual mostro un bajo numero de bacterias tolerantes (25 UFC/m³ y 45 UFC/m³).

Si comparamos los resultados de crecimiento en medio MAC 50 ppm (1.000 y 7.5x10⁴ UFC/mL) con los obtenidos en medio sin presión selectiva MSPS (5,9x10⁶ y 3,5x10⁸ UFC/mL), se evidencia que el Amonio Cuaternario presenta un alto efecto toxico sobre la microbiota acuática.

Alba & Araujo (2008, p. 22) sugieren que la interacción que posee el Amonio Cuaternario sobre la pared celular de los microorganismos, se debe a que estos están cargados negativamente por lo que facilita la adsorción de compuestos catiónicos junto con las interacciones hidrofóbicas que presenta el tensoactivo, ocasionando daños bioquímicos y metabólicos y en consecuencia ocasionando la muerte bacteriana.

3.1.3. *Determinación del crecimiento microbiano en medio sin presión selectiva MSPS.*

- (M1) Muestra 1

Tabla 9-3: Recuento microbiológico por mililitro de la Muestra 1 inoculada en medio MSPS.

| Unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro | | | | |
|---|----------|----------|----------|-------------|
| Tiempo (H) | 24 | 48 | 72 | UFC/1mL |
| M1 10 ⁻¹ A | Incontab | Incontab | Incontab | Incontab |
| M1 10 ⁻¹ B | Incontab | Incontab | Incontab | |
| M1 10 ⁻³ A | 726 | 866 | 866 | 40,725,000 |
| M1 10 ⁻³ B | 612 | 743 | 743 | |
| M110 ⁻⁵ A | 44 | 79 | 103 | 40,225,000 |
| M1 10 ⁻⁵ B | 41 | 82 | 112 | |
| Total (UFC/1mL) | | | | 288,862,500 |

Realizado por: Pérez Jeimy; 2018

- (M2) Muestra 2

Tabla 10-3: Recuento microbiológico por mililitro de la Muestra 2 inoculada en medio MSPS.

| Unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro | | | | |
|---|----------|----------|----------|-------------|
| Tiempo (H) | 24 | 48 | 72 | UFC/1mL |
| M2 10 ⁻¹ A | Incontab | Incontab | Incontab | Incontab |
| M2 10 ⁻¹ B | Incontab | Incontab | Incontab | |
| M2 10 ⁻³ A | 194 | 260 | 260 | 14,175,000 |
| M2 10 ⁻³ B | 231 | 307 | 307 | |
| M210 ⁻⁵ A | 10 | 24 | 29 | 107,500,000 |
| M2 10 ⁻⁵ B | 6 | 11 | 14 | |
| Total (UFC/1mL) | | | | 60,837,500 |

Realizado por: Pérez Jeimy; 2018

- (M3) Muestra 3

Tabla 11-3: Recuento microbiológico por mililitro de la Muestra 3 inoculada en medio MSPS.

| Unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro | | | | |
|---|----------|----------|----------|-------------|
| Tiempo (H) | 24 | 48 | 72 | UFC/1mL |
| M3 10 ⁻¹ A | Incontab | Incontab | Incontab | Incontab |
| M3 10 ⁻¹ B | Incontab | Incontab | Incontab | |
| M3 10 ⁻³ A | 521 | 750 | 750 | 38,450,000 |
| M3 10 ⁻³ B | 582 | 788 | 788 | |
| M310 ⁻⁵ A | 21 | 53 | 131 | 680,000,000 |
| M3 10 ⁻⁵ B | 28 | 74 | 141 | |
| Total (UFC/1mL) | | | | 359,225,000 |

Realizado por: Pérez Jeimy; 2018

- (M4) Muestra 4

Tabla 12-3: Recuento microbiológico por mililitro de la Muestra 4 inoculada en medio MSPS.

| Unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro | | | | |
|---|------|------|------|------------|
| Tiempo (H) | 24 | 48 | 72 | UFC/1mL |
| M4 10 ⁻¹ A | 947 | 1128 | 1128 | 636,000 |
| M4 10 ⁻¹ B | 1219 | 1416 | 1416 | |
| M4 10 ⁻³ A | 30 | 40 | 52 | 2,150,000 |
| M4 10 ⁻³ B | 18 | 26 | 34 | |
| M410 ⁻⁵ A | 0 | 3 | 4 | 15,000,000 |
| M4 10 ⁻⁵ B | 2 | 2 | 2 | |
| Total (UFC/1mL) | | | | 5,928,666 |

Realizado por: Pérez Jeimy; 2018

Los niveles de crecimiento obtenidos para las muestras indican que la Muestra 3, fue la que presentó mayor carga microbiana, seguida por la Muestra 1 y la Muestra 2, en comparación con la Muestra 4 la cual presentó la menor carga microbiana en el medio sin presión selectiva.

En el recuento microbiológico realizado a cada una las muestras en MSPS se obtuvieron como resultado valores entre $5,9 \times 10^6$ y $3,5 \times 10^8$ UFC/1mL, estos datos son superiores a los datos reportados por Torres, (2011, p. 32) en un estudio de caracterización microbiológica de las aguas residuales de la Planta de Tratamiento ubicada de la Universidad Militar Nueva Granada- Bogotá, donde se encontraron valores entre $2,3 \times 10^6$ y $4,1 \times 10^6$ UFC/1mL, con una gran variedad de microorganismos coliformes totales y coliformes fecales.

3.1.4. *Determinación del crecimiento microbiano por mililitro de cada muestra en medio MASL, MAC y MSPS.*

Tabla 13-3: Recuento microbiológico por mililitro de cada muestra de los medios MASL, MAC y MSPS.

| Recuento microbiológico por mililitro | | | | | | |
|---------------------------------------|---------------------------|-------|-------------------------|------|-------------------|------|
| Muestras | MASL 100 ppm (UFC/1mL) | % | MAC 50 ppm (UFC/1mL) | % | MSPS (UFC/1mL) | % |
| Muestra 1 | 166,000.000 | 53,5 | 75,375 | 50,1 | 288,862.500 | 40,7 |
| Muestra 2 | 13,987.500 | 4,5 | 23,750 | 15,8 | 60,837.500 | 8,6 |
| Muestra 3 | 130,037.500 | 42 | 51,250 | 34,1 | 359,225.000 | 50,7 |
| Total, Planta | 310,025.000 | 100 | 150,375 | 100 | 708,925.000 | 100 |
| Muestra 4 | 1,579.625 | 26,64 | 1,000 | 0.02 | 5,928.666 | 100 |

Realizado por: Pérez Jeimy; 2018

El recuento microbiológico realizado a cada una de las muestras en los diferentes medios de cultivo suplementados y no suplementados con tensoactivos, (Tabla 13-3) mostró un comportamiento variado, observándose que el AC presenta el mayor efecto inhibitorio sobre la microbiota del agua residual induciendo una disminución en su crecimiento de un 99,9 %, mientras que el ASL muestra un efecto inhibitorio promedio del 48 %. Estos resultados se cotejan con lo obtenido para el agua del río (M4) donde la mayor toxicidad fue mostrada por el AC (99,9 %), sin embargo, la tolerancia para el ASL fue menor (26,64%) a la encontrada en la planta (45,8%).

Es de hacer notar que aunque el número de bacterias en la planta aumenta de $2,8 \times 10^8$ UFC/1mL (muestra 1) a $3,5 \times 10^8$ UFC/1mL (muestra 3), el número de bacterias tolerantes para los dos tensoactivos disminuye: en el caso del ASL de $1,6 \times 10^8$ a $1,3 \times 10^8$ UFC/1mL y en el caso del AC

pasa de $7,5 \times 10^3$ a $5,1 \times 10^3$ UFC/1mL, lo cual estaría indicando que al paso por la planta la tolerancia de las bacterias a los tensoactivos disminuye.

Nuestra investigación ha puesto de manifiesto que el tensoactivo Amonio Cuaternario presenta mayor efecto bactericida que el ácido sulfónico lineal, cuya toxicidad se basa en la longitud de su cadena alquílica, ocasionando perturbaciones en la permeabilidad de las células bacterianas. (Ríos, 2014, pp. 56, 57).

3.2. Evaluación microscópica y tinción de Gram de los aislados bacterianos seleccionados.

Para la evaluación microscópica y tinción de Gram se procedió a escoger un cierto número al azar de los aislados bacterianos.

3.2.1. Resultados de la Tinción de Gram de los clones aislados en medio MASL.

Los resultados obtenidos de la tinción de Gram sobre los clones aislados en medio suplementado con ASL, muestran que utilizando el ASL como presión selectiva existe una preponderancia de los bacilos Gram negativos (Tabla 14-3), observándose que el 73,3% (22 clones) pertenecen al grupo de Bacterias Gram negativas de las cuales el 100 % fueron bacilos, en comparación con el 26,7% (8 clones) correspondió a Bacterias Gram positivas, de las cuales 25% presentaron morfología de cocos y 75% fueron bacilos.

Tabla 14-3: Resultados de la Tinción de Gram de los clones aislados del medio MASL

| Tinción de Gram en clones aislados de MASL | | | | | |
|--|----------------|----------------|---------|----------------|----------------|
| Clones | Gram Positivas | Gram Negativas | Clones | Gram Positivas | Gram Negativas |
| Clon 2 | Bacilos Gram+ | | Clon 22 | | Bacilos Gram- |
| Clon 3 | Cocos Gram+ | | Clon 24 | | Bacilos Gram- |
| Clon 4 | | Bacilos Gram- | Clon 26 | | Bacilos Gram- |
| Clon 5 | | Bacilos Gram- | Clon 27 | | Bacilos Gram- |
| Clon 6 | Cocos Gram+ | | Clon 29 | | Bacilos Gram- |
| Clon 8 | | Bacilos Gram- | Clon 30 | Bacilos Gram+ | |
| Clon 9 | | Bacilos Gram- | Clon 31 | Bacilos Gram+ | |
| Clon 10 | | Bacilos Gram- | Clon 32 | | Bacilos Gram- |
| Clon 11 | | Bacilos Gram- | Clon 36 | | Bacilos Gram- |
| Clon 14 | | Bacilos Gram- | Clon 37 | | Bacilos Gram- |
| Clon 15 | | Bacilos Gram- | Clon 38 | Bacilos Gram+ | |
| Clon 16 | | Bacilos Gram- | Clon 39 | Bacilos Gram+ | |
| Clon 17 | | Bacilos Gram- | Clon 45 | | Bacilos Gram- |

| | | | | | |
|---------|---------------|---------------|----------------|--|---------------|
| Clon 19 | | Bacilos Gram- | Clon 47 | | Bacilos Gram- |
| Clon 21 | Bacilos Gram+ | | Clon 48 | | Bacilos Gram- |

Realizado por: Pérez Jeimy; 2018

Los resultados obtenidos para los clones aislados a partir de medio suplementado con ácido sulfónico lineal (Tabla 14-3), coinciden con los datos obtenidos por Becerra & Horna, (2016, p. 4) en un estudio de la microbiota en aguas residuales provenientes de camales en Trujillo - Peru, donde encontraron 32,5% de Bacterias Gram positivas y el 67,5% Bacterias Gram negativas.

Según Sánchez, (2007, p. 210) sugiere que tanto bacterias Gram positivas como Gram negativas son susceptibles a tensoactivos aniónicos, de acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo de investigación las bacterias Gram positivas serían las que presentan mayor sensibilidad al ASL.

3.2.2. *Resultados de la Tinción de Gram de los clones aislados de medio MAC.*

La evaluación de la población de clones aislados en presencia de Amonio Cuaternario utilizando la Tinción de Gram, mostró que el 56% (19 clones) pertenecen al grupo de Bacterias Gram negativas de las cuales 57,9% (11 clones) fueron cocos y 42,1% (8 clones) fueron bacilos, en comparación con el 44% (15 clones) de Bacterias Gram positivas de las cuales 86,7% (13 clones) fueron cocos, 13,3% (2 clones) fueron bacilos.

Tabla 15-3: Resultados de la Tinción de Gram de los clones aislados del medio MAC.

| Tinción de Gram en clones aislados de MAC | | | | | |
|---|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Clones | Gram Positivas | Gram Negativas | Clones | Gram Positivas | Gram Negativas |
| Clon 1 | Cocos Gram+ | | Clon 22 | Cocos Gram+ | |
| Clon 2 | Cocos Gram+ | | Clon 23 | | Cocos Gram- |
| Clon 3 | Cocos Gram+ | | Clon 24 | Cocos Gram+ | |
| Clon 4 | | Cocos Gram- | Clon 27 | Cocos Gram+ | |
| Clon 6 | | Cocos Gram- | Clon 28 | Cocos Gram+ | |
| Clon 7 | Cocos Gram+ | | Clon 29 | | Bacilos Gram- |
| Clon 9 | | Bacilos Gram- | Clon 30 | | Bacilos Gram- |
| Clon 10 | Cocos Gram+ | | Clon 32 | Cocos Gram+ | |
| Clon 11 | Cocos Gram+ | | Clon 33 | Cocos Gram+ | |
| Clon 12 | | Cocos Gram- | Clon 35 | | Cocos Gram- |
| Clon 14 | | Cocos Gram- | Clon 38 | | Cocos Gram- |
| Clon 15 | | Cocos Gram- | Clon 39 | Cocos Gram+ | |

| | | | | | |
|---------|--|---------------|----------------|---------------|---------------|
| Clon 16 | | Cocos Gram- | Clon 40 | | Bacilos Gram- |
| Clon 17 | | Cocos Gram- | Clon 41 | Bacilos Gram+ | |
| Clon 18 | | Bacilos Gram- | Clon 42 | Bacilos Gram+ | |
| Clon 19 | | Bacilos Gram- | Clon 43 | | Bacilos Gram- |
| Clon 21 | | Cocos Gram- | Clon 44 | | Bacilos Gram- |

Realizado por: Pérez Jeimy; 2018

Es de hacerse notar que el 56% de clones pertenecen al grupo de Bacterias Gram negativas en comparación con el 44% de Bacterias Gram positivas (Tabla 15-3). Es importante indicar que estos resultados son diferentes a los obtenidos cuando se utilizó ASL como presión selectiva, lo que podría deberse al efecto selectivo del Amonio Cuaternario, estos resultados son diferentes en comparación con los obtenidos por Duarte & Granados, (2012, p. 5) en un estudio para evaluar el comportamiento epidemiológico de los microorganismos en un Hospital de Ginecopediatría en México, donde se obtuvieron resultados del 51,2% de Bacterias Gram positivas y el 48.8 % Bacterias Gram negativas con resistencia antimicrobiana.

3.2.3. Evaluación de Bacterias Gram Positivas y Bacterias Gram Negativas de clones aislados de medio MSPS.

Mediante la técnica de Tinción de Gram se mostró que, en el caso de los clones aislados sin presión selectiva, 55% (22 clones) pertenecen al grupo de bacterias Gram Positivas, de las cuales el 90,9% (20 clones) fueron cocos y 9,1% (2 clones) fueron bacilos, con respecto a las bacterias Gram Negativas, el 44,4% (8 clones) presentaron morfología de cocos y 55,6% (10 clones) fueron bacilos, para un total del 45% (18 clones).

Tabla 16-3: Resultados de la Tinción de Gram de los clones aislados del medio MSPS

| Tinción de Gram en clones aislados de MSPS | | | | | |
|--|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Clones | Gram Positivas | Gram Negativas | Clones | Gram Positivas | Gram Negativas |
| Clon 2 | | Bacilos Gram- | Clon 25 | Cocos Gram+ | |
| Clon 3 | Cocos Gram+ | | Clon 26 | Cocos Gram+ | |
| Clon 4 | Cocos Gram+ | | Clon 27 | | Cocos Gram- |
| Clon 5 | | Bacilos Gram- | Clon 29 | | Cocos Gram- |
| Clon 6 | Cocos Gram+ | | Clon 31 | | Cocos Gram- |
| Clon 7 | | Cocos Gram- | Clon 32 | Cocos Gram+ | |
| Clon 9 | | Bacilos Gram- | Clon 33 | | Cocos Gram- |
| Clon 10 | Cocos Gram+ | | Clon 36 | Cocos Gram+ | |
| Clon 11 | Cocos Gram+ | | Clon 37 | Cocos Gram+ | |
| Clon 12 | Cocos Gram+ | | Clon 38 | Cocos Gram+ | |

| | | | | | |
|---------|---------------|---------------|----------------|---------------|---------------|
| Clon 13 | Cocos Gram+ | | Clon 39 | | Bacilos Gram- |
| Clon 14 | | Cocos Gram- | Clon 40 | Cocos Gram+ | |
| Clon 16 | Cocos Gram+ | | Clon 41 | | Bacilos Gram- |
| Clon 17 | | Cocos Gram- | Clon 42 | | Bacilos Gram- |
| Clon 18 | | Bacilos Gram- | Clon 43 | Cocos Gram+ | |
| Clon 19 | Cocos Gram+ | | Clon 44 | | Bacilos Gram- |
| Clon 20 | Bacilos Gram+ | | Clon 45 | Bacilos Gram+ | |
| Clon 21 | Cocos Gram+ | | Clon 46 | Cocos Gram+ | |
| Clon 22 | | Cocos Gram- | Clon 47 | | Bacilos Gram- |
| Clon 23 | Cocos Gram+ | | Clon 48 | | Bacilos Gram- |

Realizado por: Pérez Jeimy; 2018

La presencia del 45% de clones pertenecientes al grupo de Bacterias Gram negativas en comparación con el 55% de Bacterias Gram positivas que se obtuvieron de los clones aislados del medio sin presión selectiva según la Tabla 16-3, coinciden con los datos obtenidos por Ortiz, et al., (2009, p. 14) durante un estudio del aislamiento de la microbiota de muestras de aguas oceánicas provenientes de Cuba, donde se obtuvieron resultados del 76% de Bacterias Gram positivas y el 24% Bacterias Gram negativas.

3.3. Determinación de la tolerancia de clones aislados a diferentes concentraciones de Tensoactivos

Los resultados de la evaluación de la tolerancia frente a los tensoactivos Ácido sulfónico lineal y Amonio Cuaternario de los clones aislados se muestra en los siguientes Gráficos, donde se observa una tolerancia variable.

3.3.1. Evaluación de la Tolerancia de clones aislados del medio suplementado con Ácido sulfónico lineal a diferentes concentraciones de ASL.

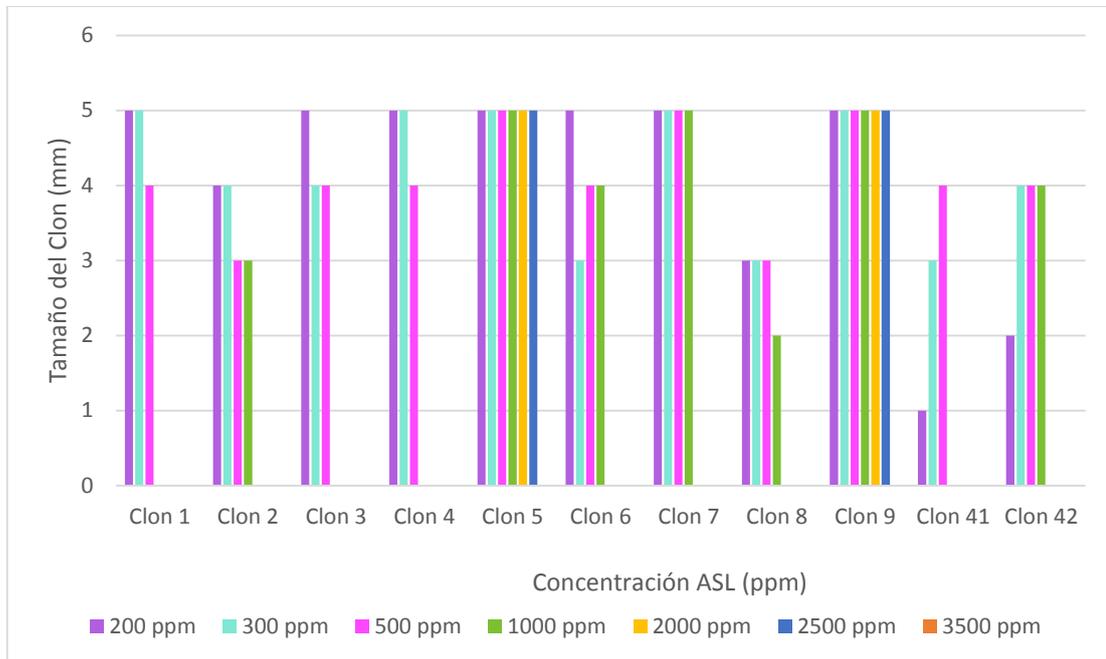


Gráfico 1-3: Efecto de ASL a diferentes concentraciones sobre el crecimiento de clones bacterianos aislados a partir de la Muestra 1.

Realizado por: Pérez Jeimy; 2018

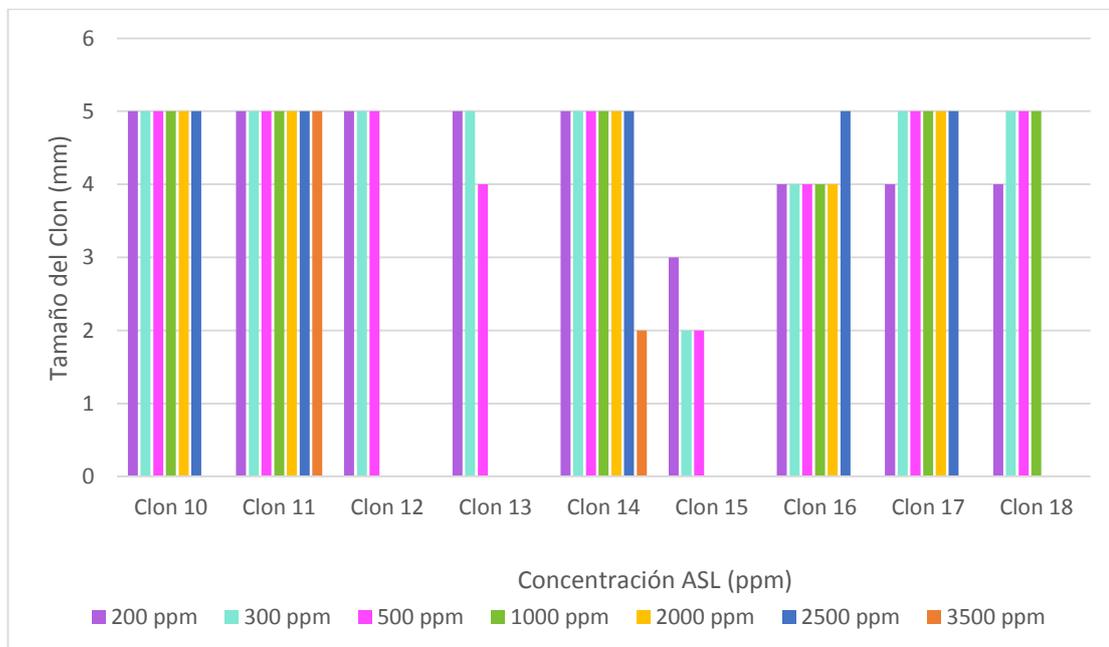


Gráfico 2-3: Efecto de ASL a diferentes concentraciones sobre el crecimiento de clones bacterianos aislados a partir de la Muestra 2.

Realizado por: Pérez Jeimy; 2018

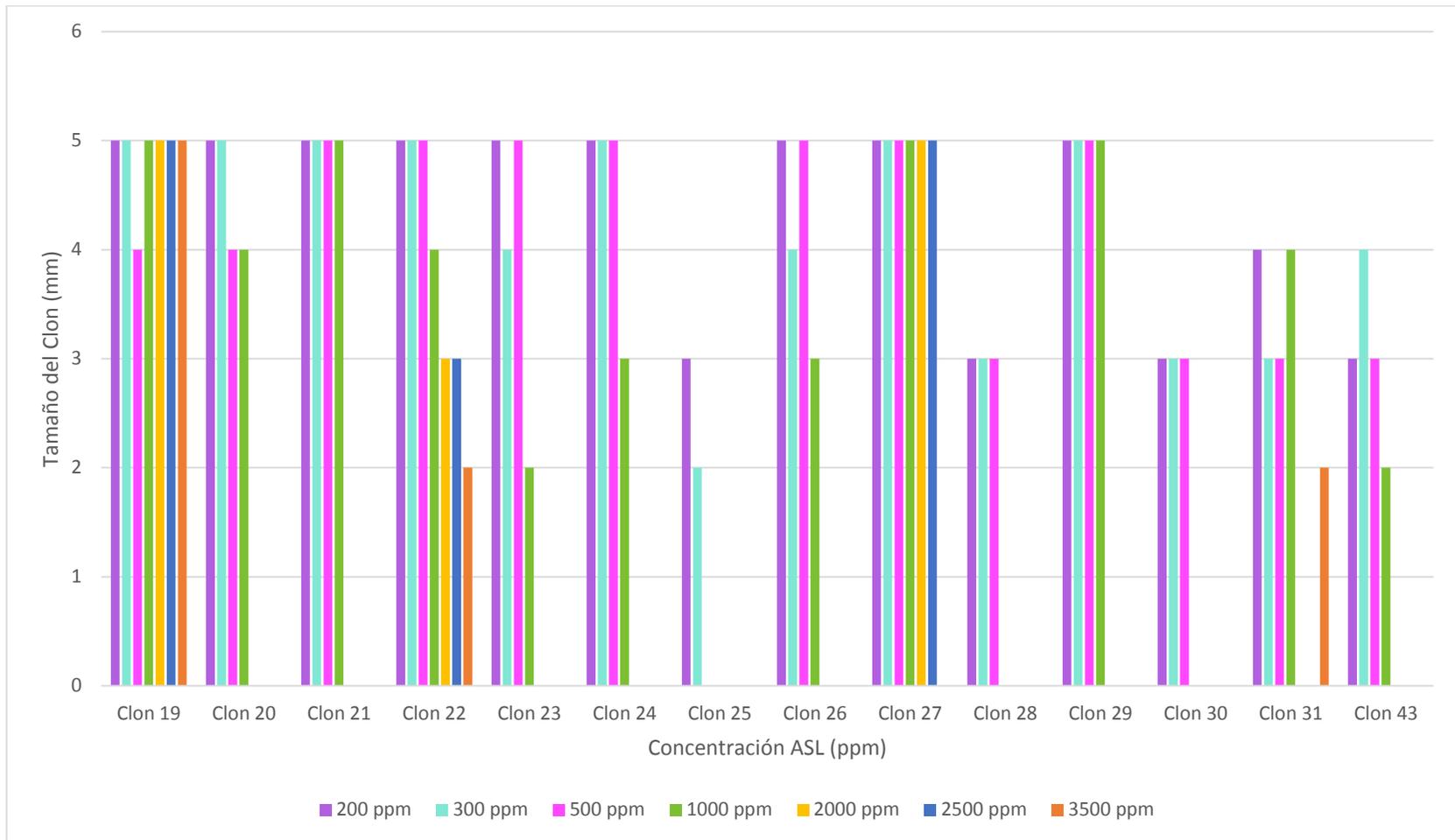


Gráfico 3-3: Efecto de ASL a diferentes concentraciones sobre el crecimiento de clones bacterianos aislados a partir de la Muestra 3.

Realizado por: Pérez, Jeimy; 2018

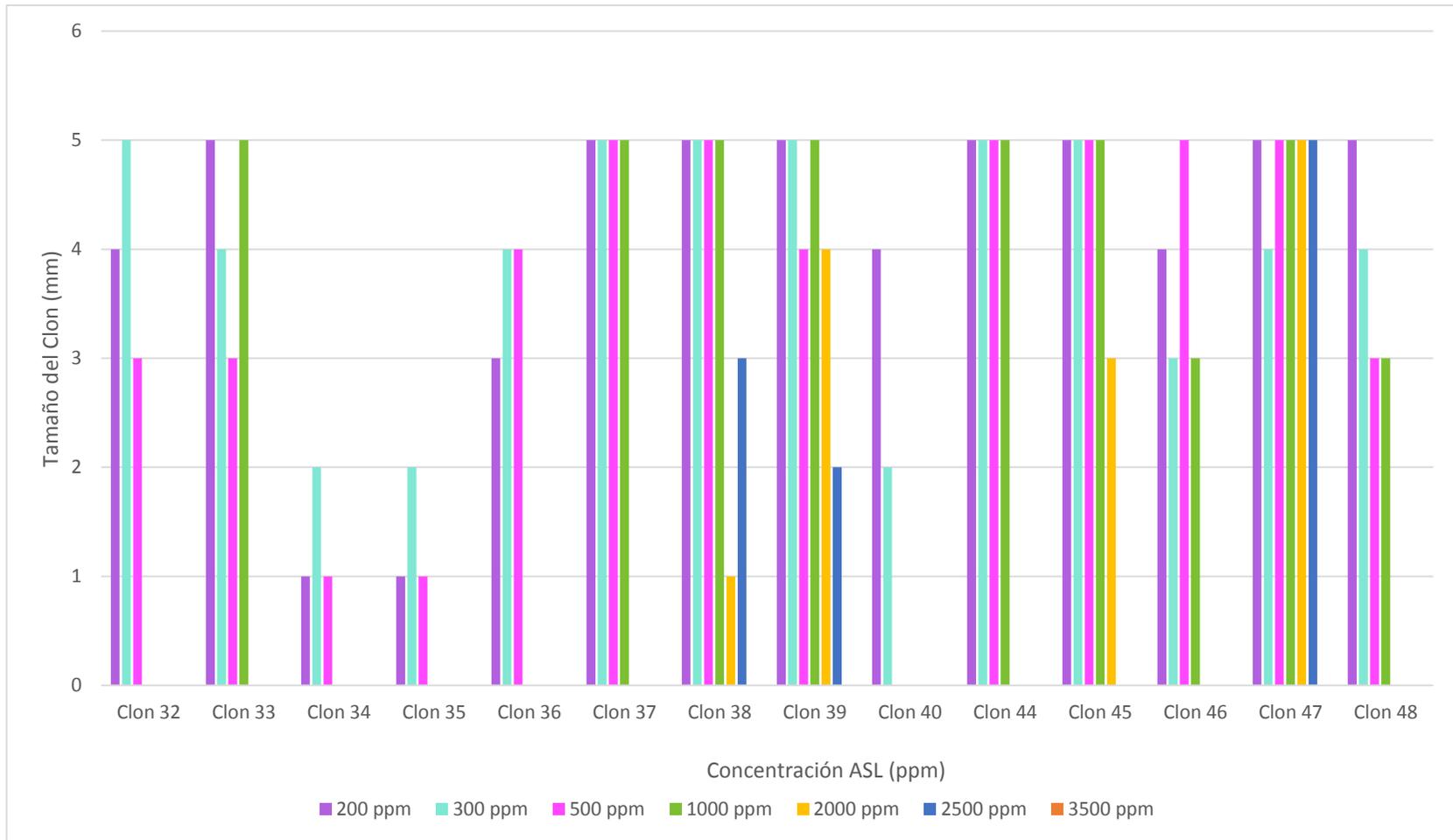


Gráfico 4-3: Efecto de ASL a diferentes concentraciones sobre el crecimiento de clones bacterianos aislados a partir de la Muestra 4.

Realizado por: Pérez, Jeimy; 2018

Las pruebas de tolerancia de los clones aislados en medios suplementados con ácido sulfónico lineal mostraron que los Clones 5 y 9 pertenecientes a la Muestra 1; los Clones 10, 14, 16 y 17 pertenecientes a la Muestra 2; el Clon 27 perteneciente a la Muestra 3 y el Clon 47 perteneciente a la Muestra 4 fueron los que presentaron mayor tolerancia al tensoactivo mostrando crecimiento hasta una concentración de 2500 ppm.

El Clon 11 (bacilo Gram Negativo) perteneciente a la Muestra 2 y el Clon 19 (bacilos Gram Negativo) perteneciente a la Muestra 3 mostraron ser los únicos capaces de tolerar el ácido sulfónico lineal hasta concentraciones de 3500 ppm.

Los niveles de tolerancia mostrados por los clones aislados en este estudio son muy superiores a los reportados por Sánchez, (2007, p. 215), para *Enterobacter aerogenes* el cual presentó el mayor nivel de tolerancia en presencia de Ácido dodecibenceno sulfónico lineal a una concentración de 500 ppm.

3.3.2. Evaluación de la Tolerancia de clones aislados del medio suplementado con Amonio Cuaternario a diferentes concentraciones de AC.

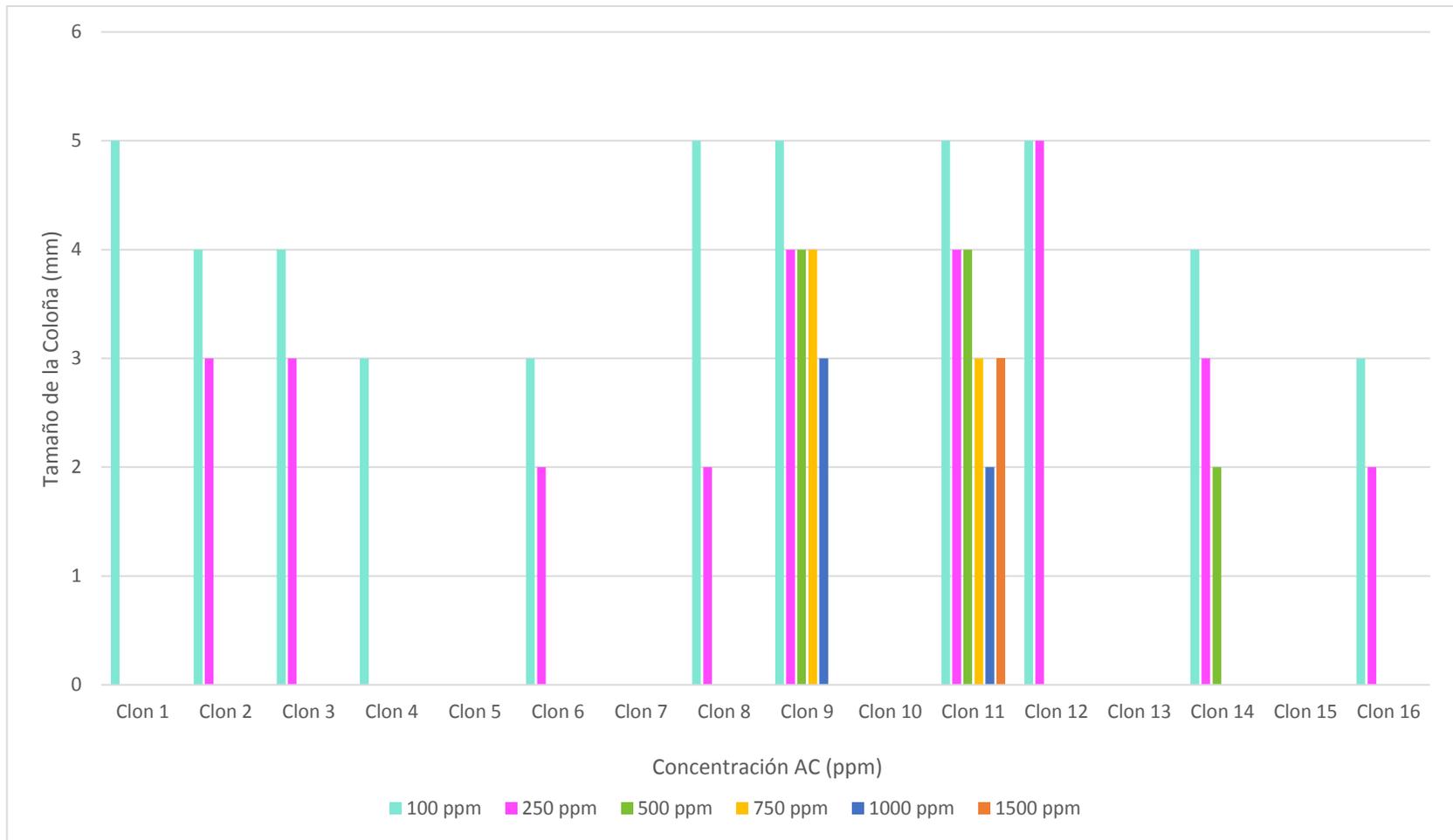


Gráfico 5-3: Efecto de AC a diferentes concentraciones sobre el crecimiento de clones bacterianos aislados a partir de la Muestra 1.

Realizado por: Pérez, Jeimy; 2018

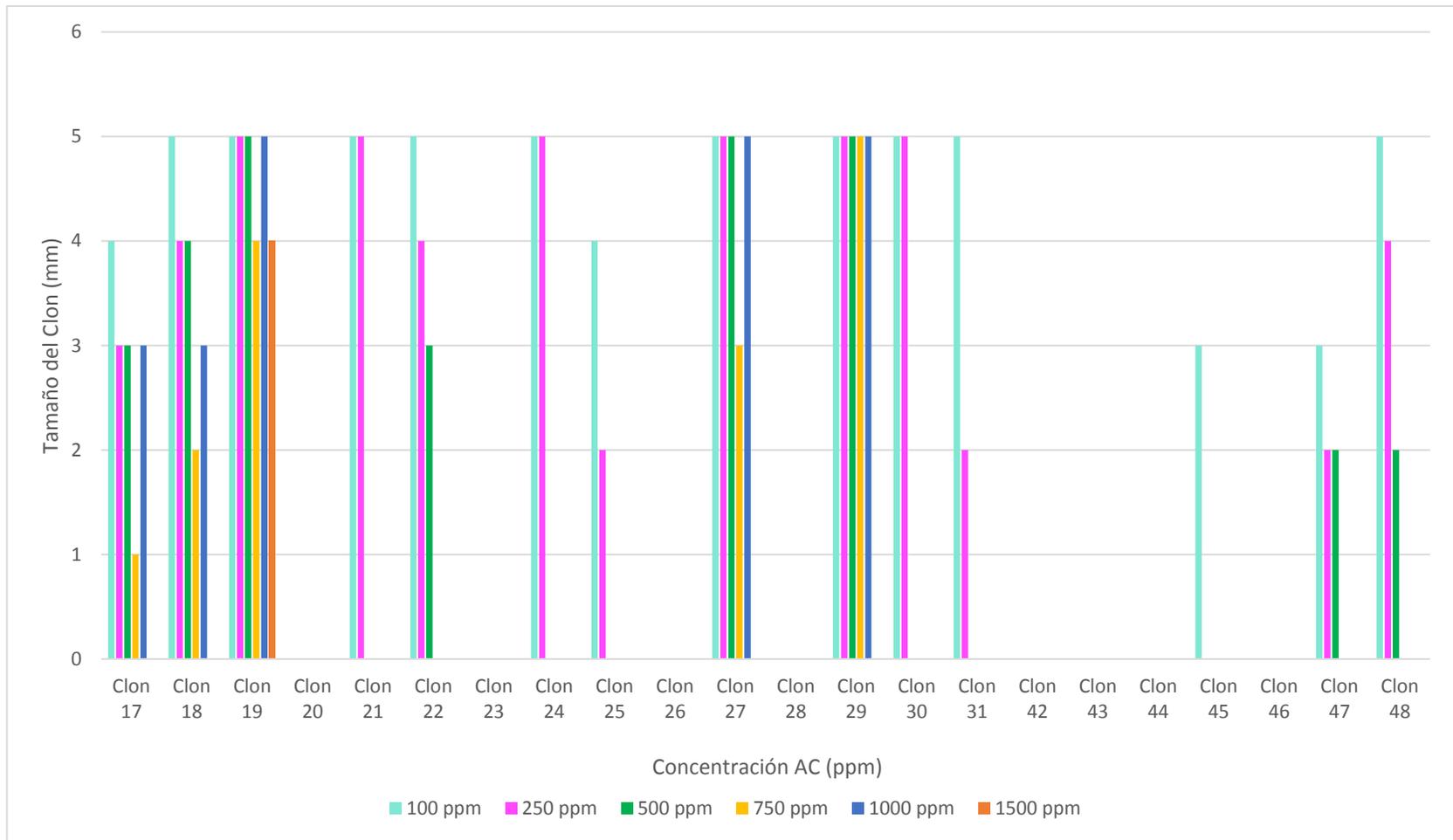


Gráfico 6-3: Efecto de AC a diferentes concentraciones sobre el crecimiento de clones bacterianos aislados a partir de la Muestra 2.

Realizado por: Pérez, Jeimy; 2018

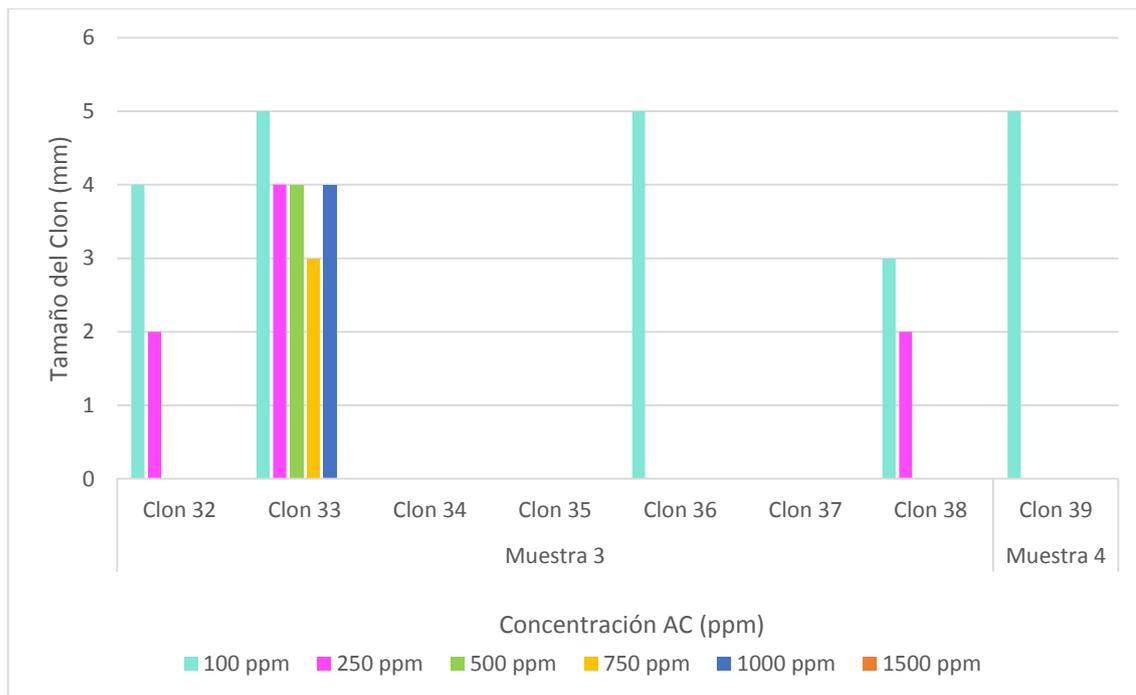


Gráfico 7-3: Efecto de AC a diferentes concentraciones sobre el crecimiento de clones bacterianos aislados a partir de la Muestra 3 y Muestra 4.

Realizado por: Pérez Jeimy; 2018

El Amonio cuaternario, mostro un marcado efecto toxico sobre los clones obtenidos de las diferentes muestras, a diferencia de lo encontrado con el ASL. Los clones 5, 7, 10, 13, 15 pertenecientes a la Muestra 1 (Grafica 5-3); 20, 23, 26, 28, 42, 43, 44, 46 pertenecientes a la Muestra 2 (Grafica 6-3) y el 34, 35, 37 pertenecientes a la Muestra 3 (Grafica 7-3), presentaron inhibición total del crecimiento ante la concentración mínima utilizada (100 ppm). No obstante, dos de los clones evaluados: el Clon 11 perteneciente a la Muestra 1 y el Clon 19 perteneciente a la Muestra 2 mostraron crecimiento en medio suplementado con concentraciones de 1500 ppm de AC.

3.3.3. *Evaluación de la Tolerancia de clones aislados del medio MASL, MAC y MSPS a diferentes concentraciones de Nonil Fenol 9 moles.*

Con el fin de conocer la tolerancia de los clones aislados ante el Nonil fenol 9 moles, se procedió a seleccionar (Clones del medio MASL, MAC y MSPS) un grupo de clones para evaluar el crecimiento en medios suplementados con este tensoactivo. Los resultados obtenidos muestran que los clones seleccionados presentan una alta tolerancia a las concentraciones ensayadas como se muestra a continuación en los diferentes gráficos (Grafico 8-3, Grafico 9-3, Grafico 10-3, Grafico 11-3)

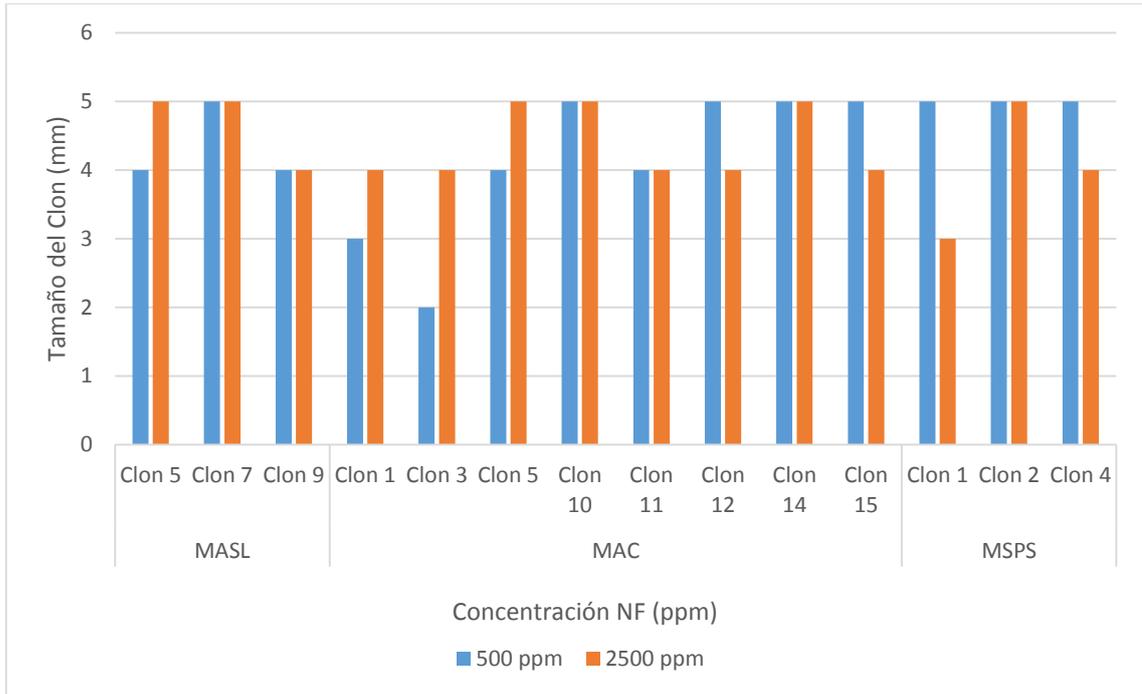


Gráfico 8-3: Efecto de NF a concentraciones de 500 y 2500 ppm sobre el crecimiento microbiano en clones aislados del medio MASL, MAC y MSPS, pertenecientes a la Muestra 1.

Realizado por: Pérez Jeimy; 2018

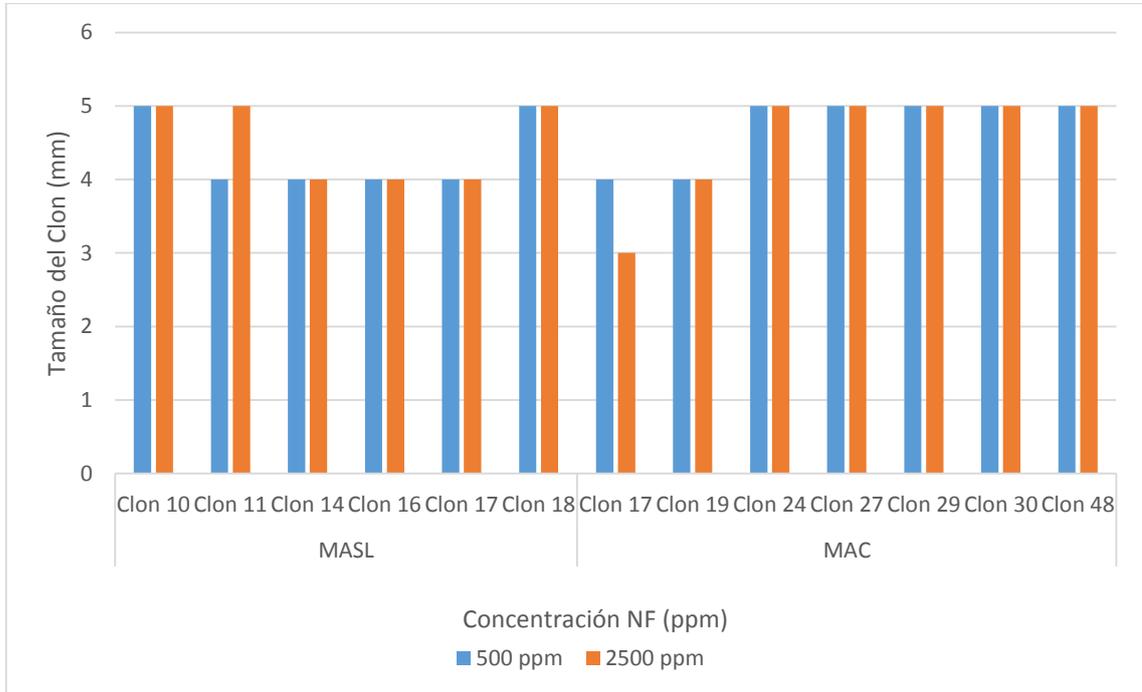


Gráfico 9-3: Efecto de NF a concentraciones de 500 y 2500 ppm sobre el crecimiento microbiano en clones aislados del medio MASL y MAC, pertenecientes a la Muestra 2.

Realizado por: Pérez Jeimy; 2018

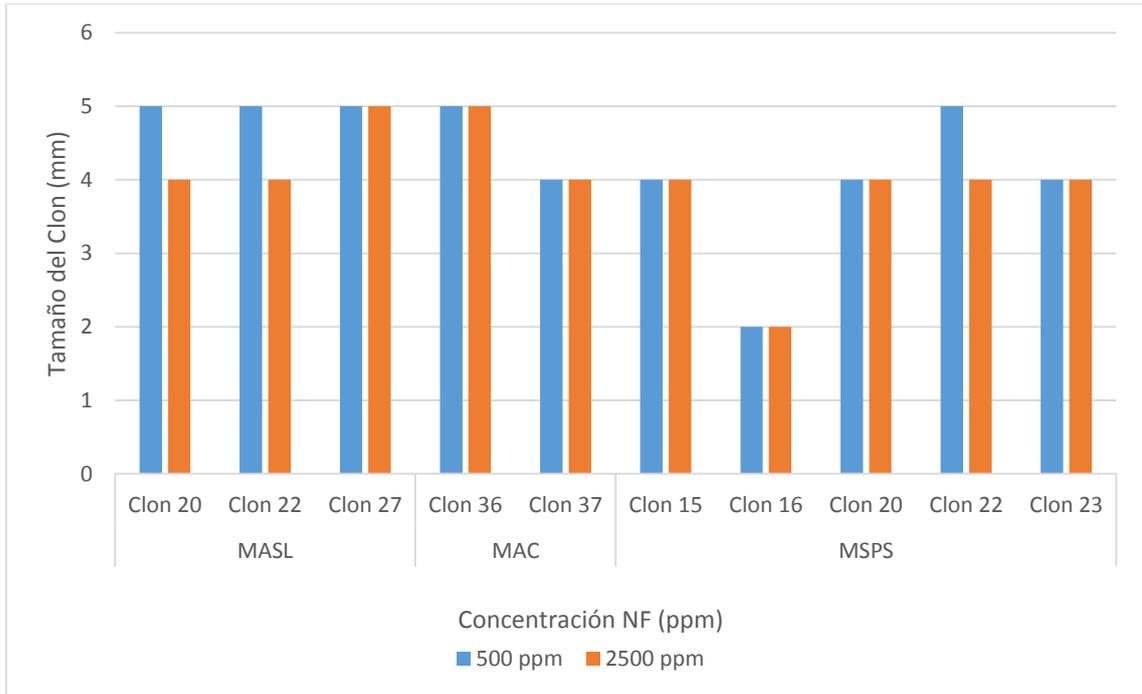


Gráfico 10-3: Efecto de NF a concentraciones de 500 y 2500 ppm sobre el crecimiento microbiano en clones aislados del medio MASL, MAC y MSPS, pertenecientes a la Muestra 3.

Realizado por: Pérez Jeimy; 2018

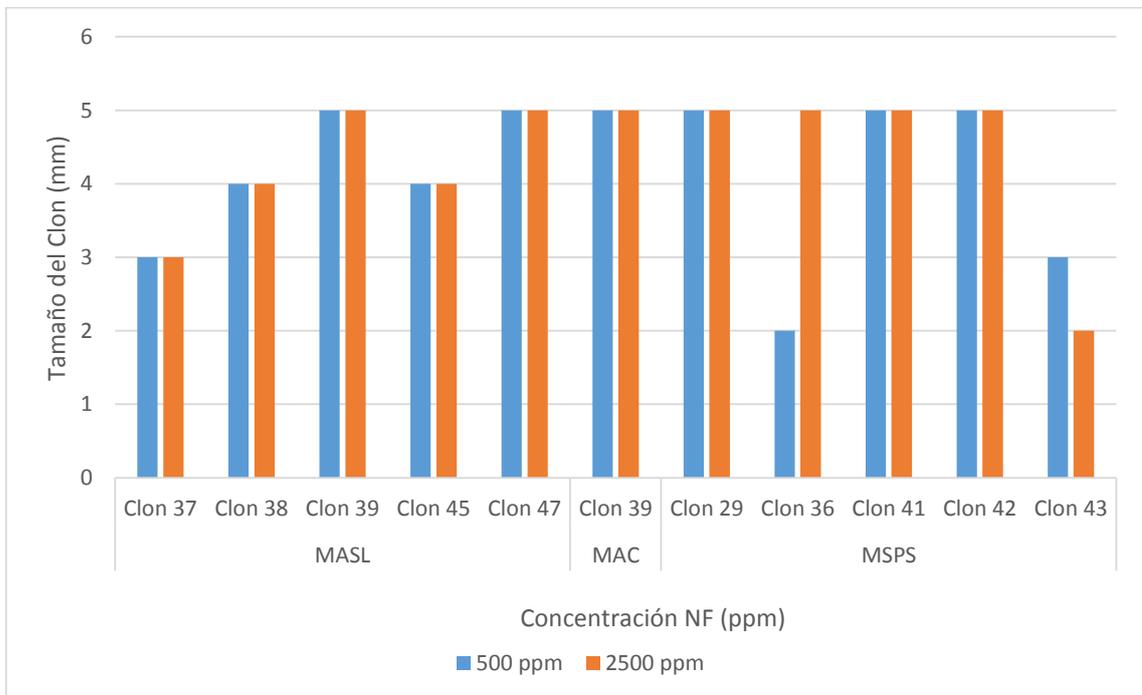


Gráfico 11-3: Efecto de NF a concentraciones de 500 y 2500 ppm sobre el crecimiento microbiano en clones aislados del medio MASL, MAC y MSPS, pertenecientes a la Muestra 4.

Realizado por: Pérez Jeimy; 2018

En base a los datos obtenidos se estima que la Muestra 2 fue la que presentó mayor número de clones tolerantes hasta concentraciones de 2500 ppm de NF, seguida de la Muestra 4, la Muestra 1 y por último la Muestra 3 quien presentó el menor número de clones tolerantes a NF 2500 ppm en comparación con las demás Muestras evaluadas.

Todos los clones aislados de las diferentes muestras demostraron tener la capacidad de tolerar hasta concentraciones de 2500 ppm de NF, según Sibila, (2008, p. 106) durante el estudio de biodegradación de tensoactivos no iónicos utilizando nonilfenol etoxilado como única fuente de carbono a una concentración de 12 ppm en un medio acuático marino, se demostró la mineralización del tensoactivo no iónico en un porcentaje mayor al 80% en un tiempo de 53 días, lo que indicaría la presencia de microorganismos con capacidad degradativa a bajas concentraciones del toxico. En nuestro caso, todos los clones evaluados mostraron un buen crecimiento (sobre un nivel de 2) ante 2500 ppm del tensoactivo, incluso aquellos clones que fueron aislados sin presión selectiva.

Según Ríos, (2014, p. 55), los tensoactivos no iónicos, presentan una baja toxicidad en comparación con los tensoactivos catiónicos y aniónicos. Asumimos que esta es una de las razones por las que nuestros clones poseen un buen desarrollo en presencia de concentraciones hasta de 2500 ppm.

3.4. Determinación del comportamiento de los diferentes clones aislados del medio MASL, MAC y MSPS frente a Amonio Cuaternario 500 ppm, Lauril sulfonato de sodio 500 ppm y sin presión selectiva.

3.4.1. Evaluación del comportamiento de los clones aislados utilizando Acido Sulfónico Lineal frente a AC 500 ppm, LSS 500 ppm y sin presión selectiva.

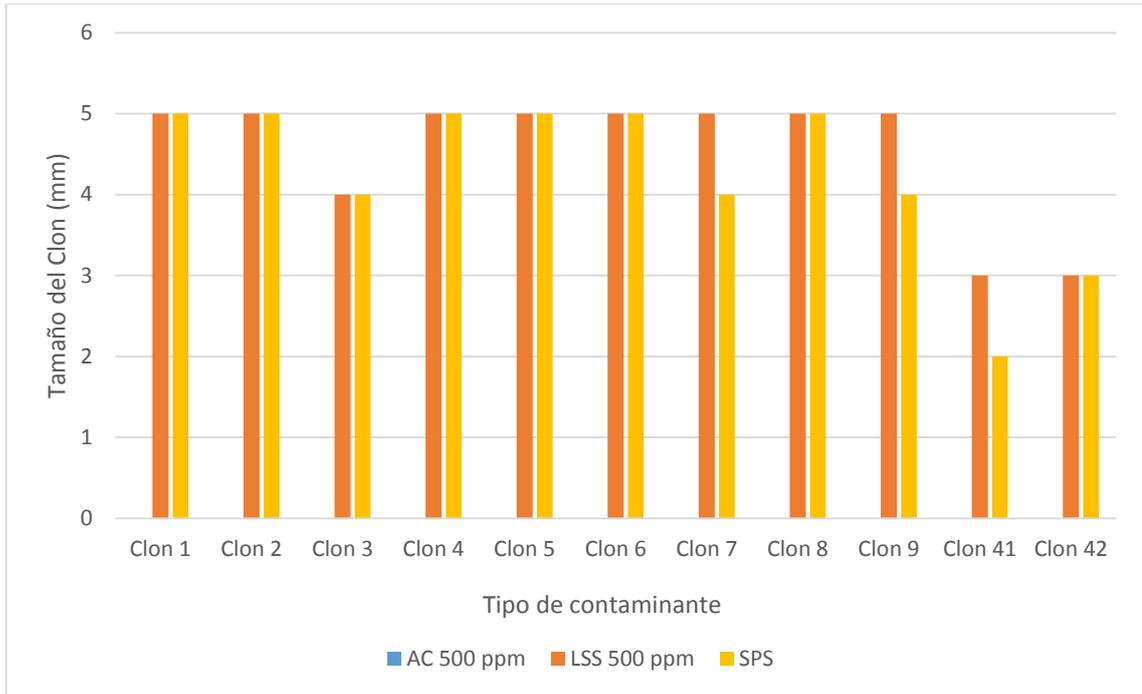


Gráfico 12-3: Crecimiento de los clones aislados de la Muestra 1 utilizando ASL como presión selectiva, en presencia de AC 500 ppm, LSS 500 ppm y sin tensoactivo (SPS).

Realizado por: Pérez Jeimy; 2018

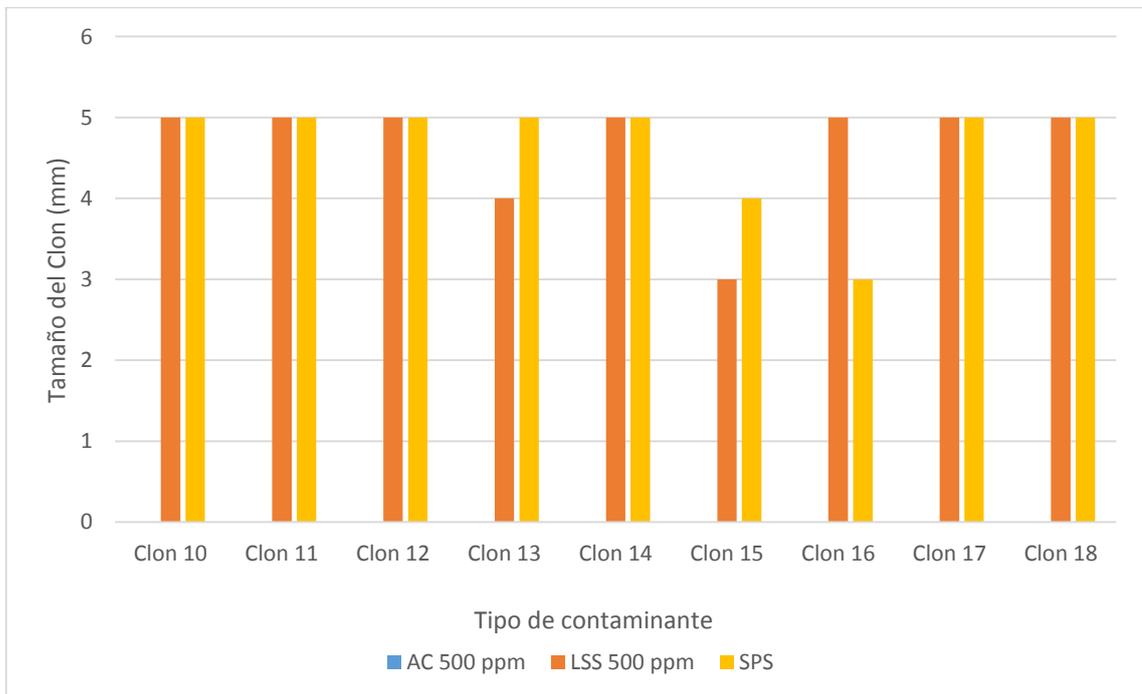


Gráfico 13-3: Crecimiento de los clones aislados de la Muestra 2 utilizando ASL como presión selectiva, en presencia de AC 500 ppm, LSS 500 ppm y control sin tensoactivo (SPS).

Realizado por: Pérez Jeimy; 2018

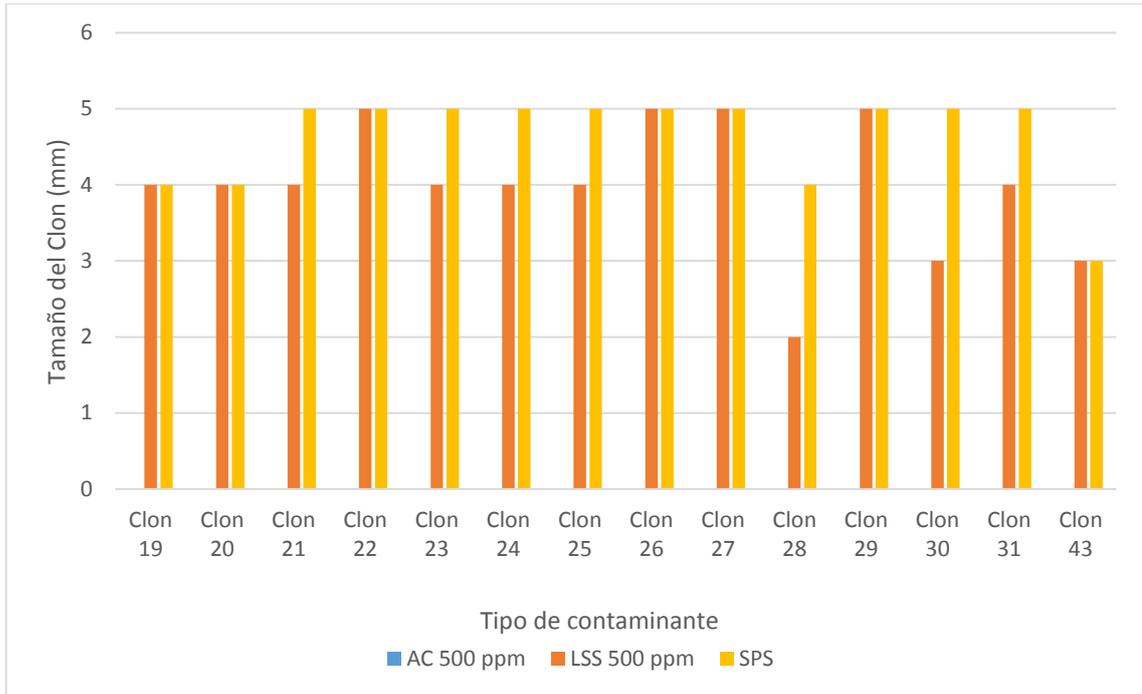


Gráfico 14-3: Crecimiento de los clones aislados de la Muestra 3 utilizando ASL como presión selectiva, en presencia de AC 500 ppm, LSS 500 ppm y control sin tensoactivo (SPS).

Realizado por: Pérez Jeimy; 2018

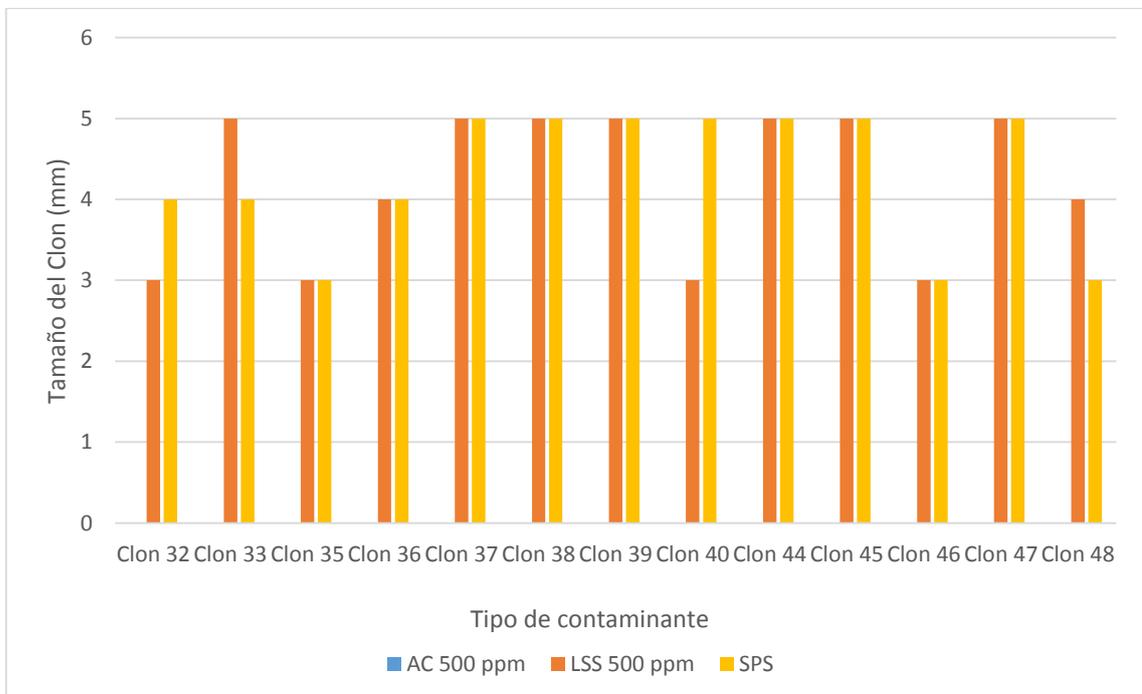


Gráfico 15-3: Crecimiento de los clones aislados de la Muestra 4 utilizando ASL como presión selectiva, en presencia de AC 500 ppm, LSS 500 ppm y control sin tensoactivo (SPS).

Realizado por: Pérez Jeimy; 2018

En base a los resultados obtenidos (Gráfico 12-3, Gráfico 13-3, Gráfico 14-3 y Gráfico 15-3) se estima que la Muestra 1 fue la que presentó mayor número de clones tolerantes hasta concentraciones de 500 ppm de LSS, seguida de la Muestra 4, la Muestra 2 y por último la Muestra 3 quien presento el menor número de clones tolerantes a LSS 500 ppm en comparación con las demás Muestras evaluadas.

Los clones aislados en medio MASL de las diferentes Muestras mostraron tener un buen crecimiento en el medio suplementado con 500 ppm de LSS, sin embargo no mostraron crecimiento presencia de la misma concentración del Tensoactivo AC, lo que indicaría que en la población evaluada el tensoactivo AC es el más toxico y que cuando se utiliza el ASL como presión selectiva, los clones aislados bajo esta condición no poseen tolerancia ante el AC, según Alba & Araujo, (2008, p. 22) esto podría deberse a la acción desinfectante que posee el Amonio Cuaternario sobre los microorganismo al degradar los lípidos y proteínas de la membrana citoplasmática, provocando entonces la desnaturalización de sus enzimas, bloqueando el metabolismo. Estos resultados están de acuerdo con lo indicado por Ríos, (2014, p. 55), quien afirma que los tensoactivos catiónicos presentan mayor toxicidad que los aniónicos.

3.4.2. Evaluación del comportamiento de los clones aislados a partir de medio MAC frente a ASL 1000 ppm, LSS y sin presión selectiva.

La evaluación de la tolerancia de los clones aislados a partir de medio suplementado con AC (Grafico 16-3, Grafico 17-3 y Grafico 18-3), mostro un comportamiento diferente al presentado por los clones aislados utilizando el ASL como presión selectiva. Con excepción de los clones 32 y 38 pertenecientes a la Muestra 3, quienes solo mostraron crecimiento en presencia de ASL (Grafico 18-3) todos los clones presentaron un buen crecimiento en todos los medios utilizados.

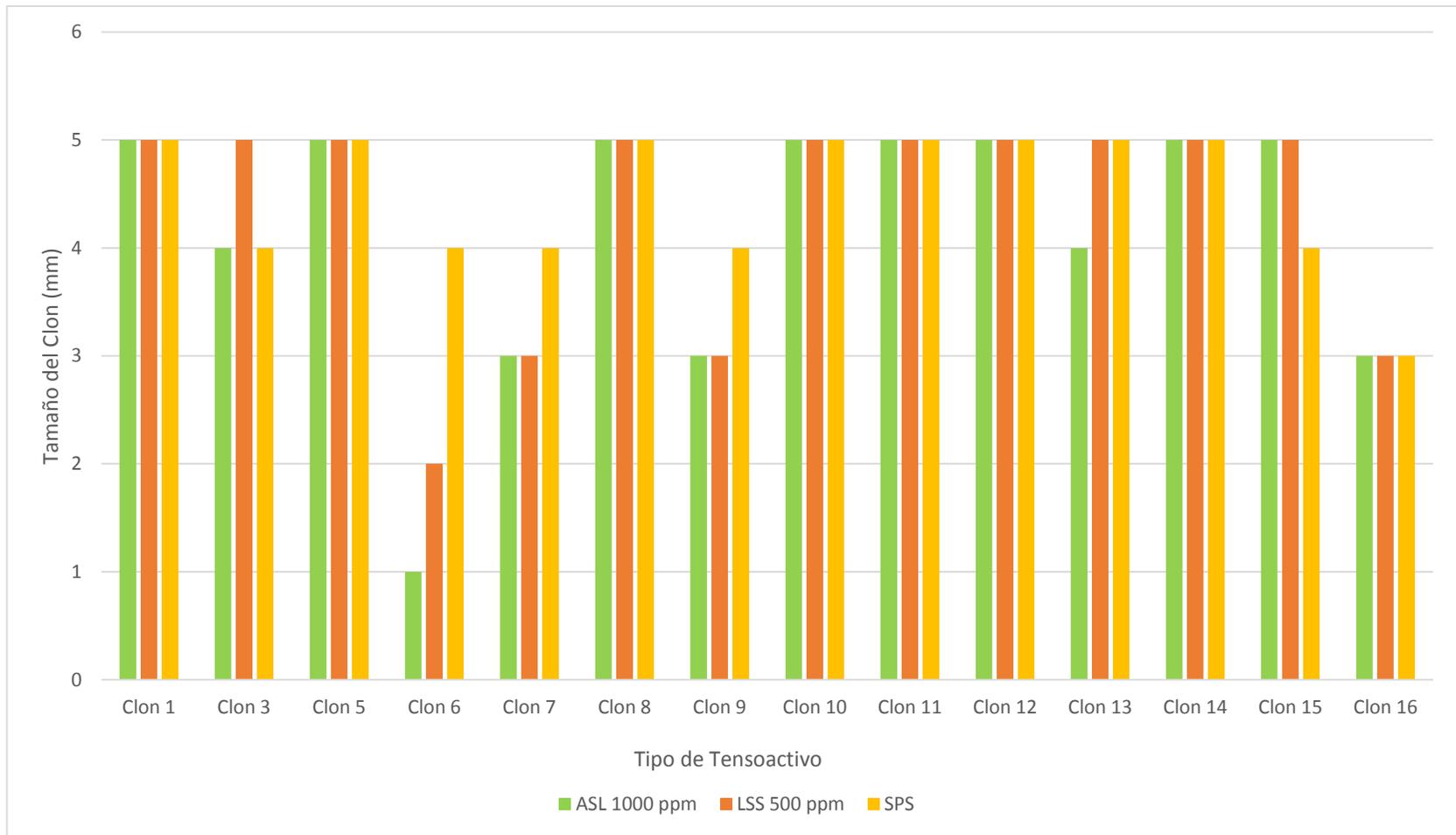


Gráfico 16-3: Crecimiento de los clones aislados de la Muestra 1 utilizando AC como presión selectiva, en presencia de ASL 1000 ppm, LSS 500 ppm y control sin tensoactivo (SPS).

Realizado por: Pérez Jeimy; 2018

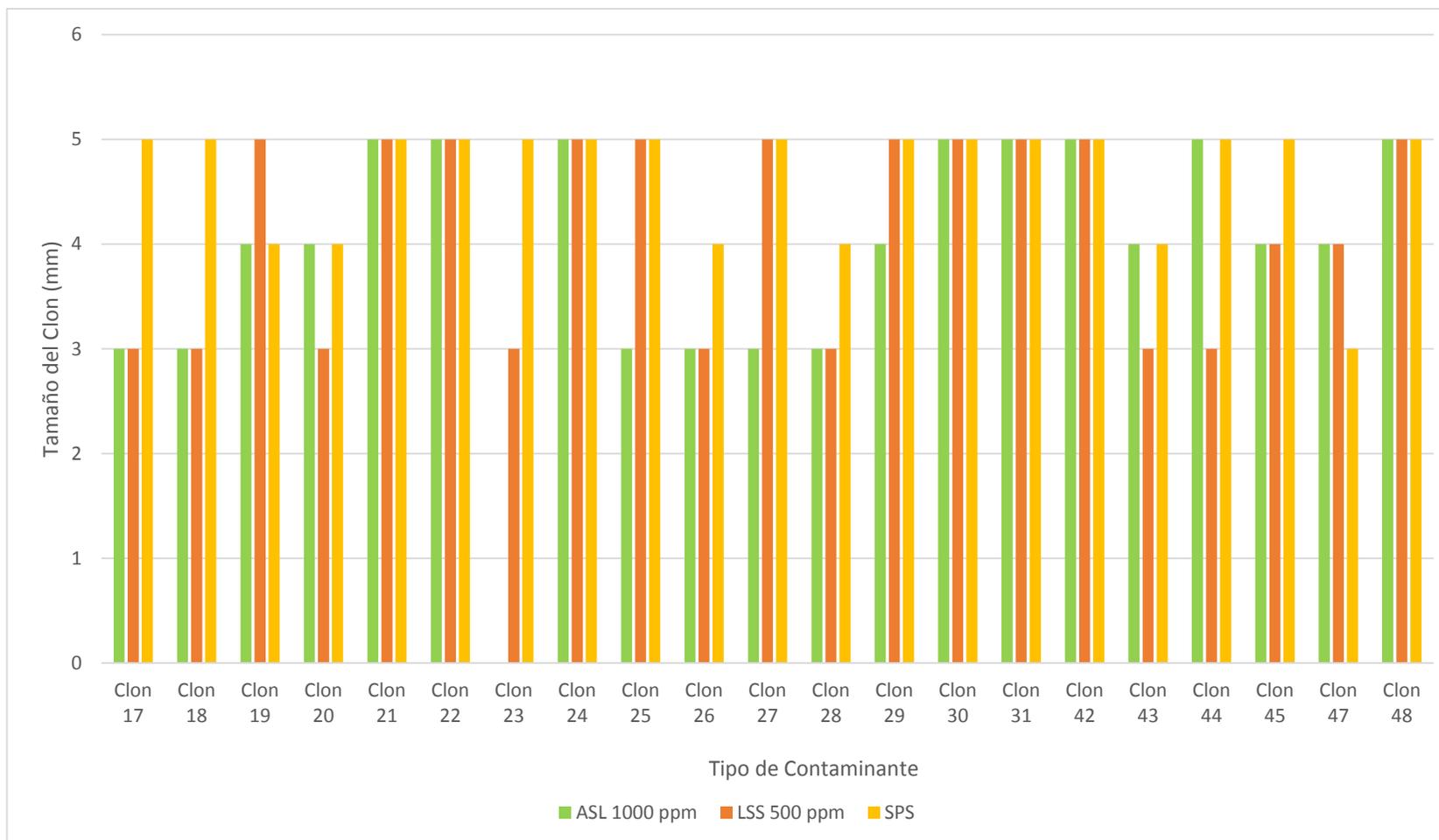


Gráfico 17-3: Crecimiento de los clones aislados de la Muestra 2 utilizando AC como presión selectiva, en presencia de ASL 1000 ppm, LSS 500 ppm y control sin tensoactivo (SPS).

Realizado por: Pérez Jeimy, 2018

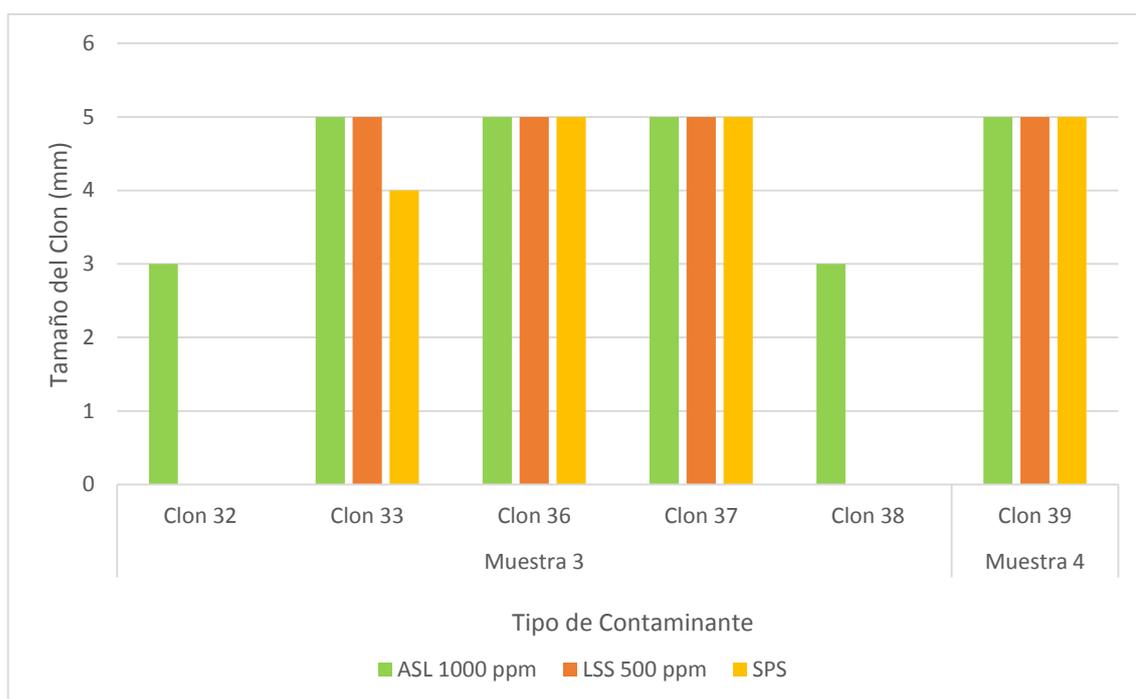


Gráfico 18-3: Crecimiento de los clones aislados de la Muestra 3 y Muestra 4 utilizando AC como presión selectiva, en presencia de ASL 1000 ppm, LSS 500 ppm y control sin tensoactivo (SPS).

Realizado por: Pérez Jeimy; 2018

En base a los resultados obtenidos se puede evidenciar que el Clon 6 perteneciente a la Muestra 1 (Gráfico 16-3); el Clon 23, perteneciente a la Muestra 2 (Gráfico 17-3), fueron los que presentaron mayor inhibición en su crecimiento bacteriano a concentraciones de 1000 ppm de ASL, tomando como control el medio sin presión selectiva.

En base a los resultados de crecimiento de los clones aislados de MSPS de las diferentes Muestras evaluadas, se encontró que la Muestra 1 fue la que presentó el mayor número de clones tolerantes hasta concentraciones de 1000 ppm de ASL y 500 ppm de LSS, seguida de la Muestra 2, la Muestra 3 y por último la Muestra 4 quien presentó un solo Clon tolerante a los diferentes tensoactivos evaluados, concluyendo que el tensoactivo ASL y LSS presentan similitud en su toxicidad frente al crecimiento bacteriano. , cuando se utilizan clones tolerantes al Amonio Cuaternario.

Si se observan los resultados presentados en los Gráfico 16-3, Gráfico 17-3 y Gráfico 18-3 se puede concluir que la selección de clones bacterianos en presencia del Amonio Cuaternario permite obtener clones con mayor capacidad de tolerar a otros tensoactivos.

3.4.3. Evaluación del comportamiento de los clones aislados del medio sin presión selectiva frente a AC 500 ppm, LSS 500 ppm y ASL 1000 ppm.

La evaluación del efecto de los tensoactivos AC, LSS y ASL, sobre el crecimiento de los clones aislados sin presión selectiva (SPS) mostro, un comportamiento variable (Gráfico 19-3, Gráfico 20-3, Gráfico 21-3 y Gráfico 22-3).

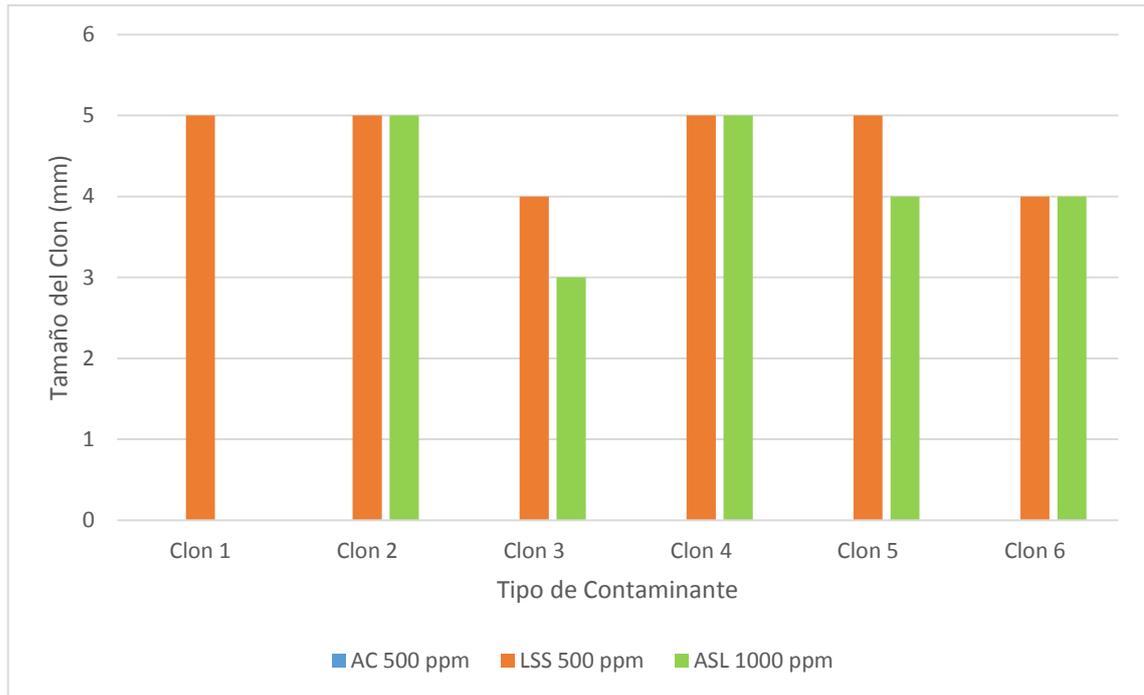


Gráfico 19-3: Crecimiento de los clones aislados de la Muestra 1 utilizando medio sin presión selectiva, en presencia de, AC 500 ppm, LSS 500 ppm y ASL 1000 ppm.

Realizado por: Pérez Jeimy; 2018

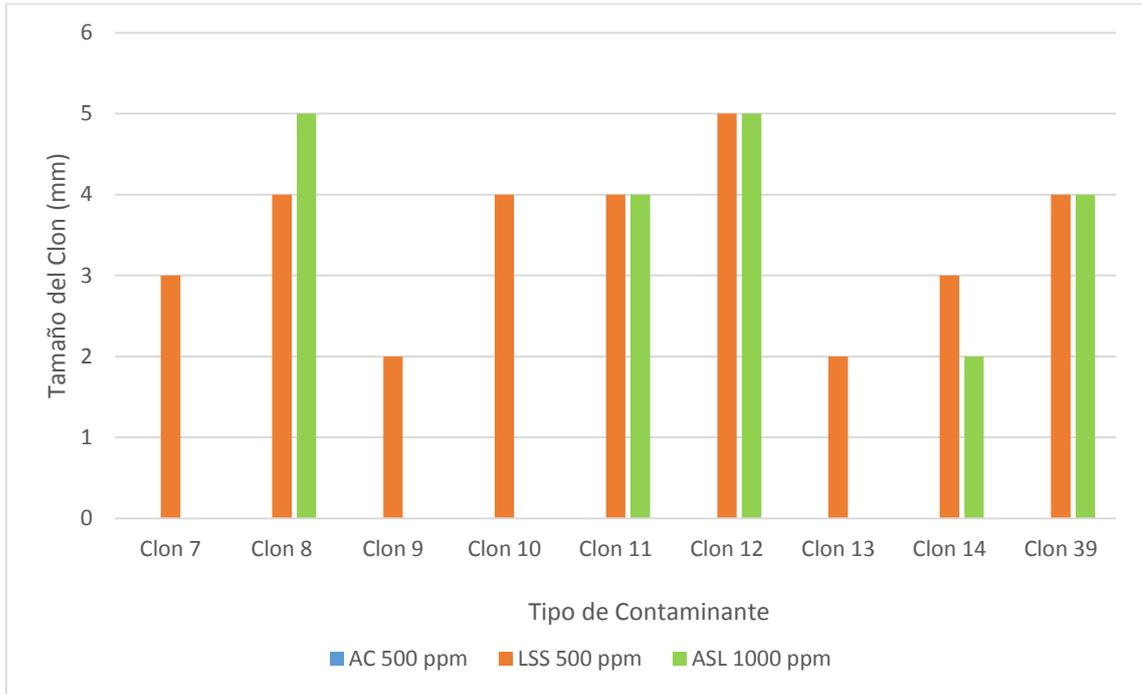


Gráfico 20-3: Crecimiento de los clones aislados de la Muestra 2 utilizando medio sin presión selectiva, en presencia de, AC 500 ppm, LSS 500 ppm y ASL 1000 ppm

Realizado por: Pérez Jeimy; 2018

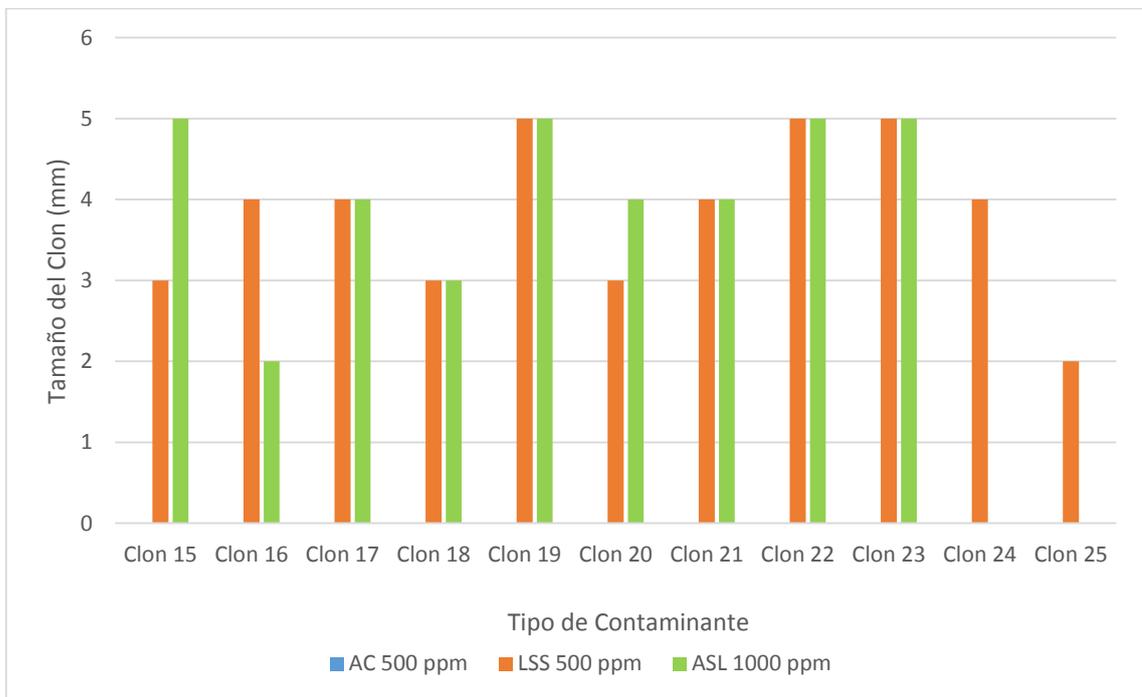


Gráfico 21-3: Crecimiento de los clones aislados de la Muestra 3 utilizando medio sin presión selectiva, en presencia de, AC 500 ppm, LSS 500 ppm y ASL 1000 ppm.

Realizado por: Pérez Jeimy; 2018

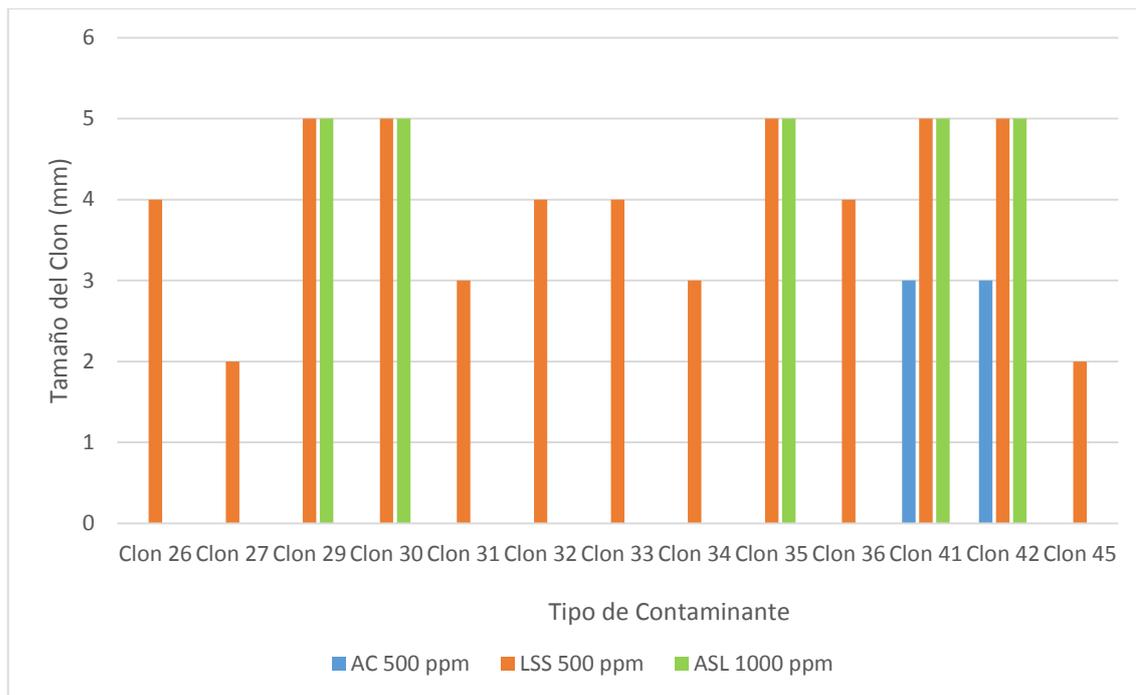


Gráfico 22-3: Crecimiento de los clones aislados de la Muestra 4 utilizando medio sin presión selectiva, en presencia de AC 500 ppm, LSS 500 ppm y ASL 1000 ppm.

Realizado por: Pérez Jeimy; 2018

Los resultados obtenidos muestran que los Clones 41 y 42 pertenecientes a la Muestra 4 (Gráfico 22-3), fueron los únicos clones capaces de crecer en todas las condiciones evaluadas y en particular en presencia de AC a 500 ppm, por lo que se considera a estos clones como los que poseen mayor capacidad adaptativa frente a medios hostiles.

El ASL (1000 ppm) resulto medianamente toxico generando inhibición en el crecimiento del clon 1 perteneciente a la Muestra 1; los Clones 7, 9, 10, 13 perteneciente a la Muestra 2; el 24, 25 perteneciente a la Muestra 3; y los Clones 26, 27, 31, 32, 33, 34, 36, 45 y 25 perteneciente a la Muestra 4, presentaron inhibición a concentraciones de ASL en un tiempo de 72 horas.

En base a los resultados se estima que la Muestra 4 fue la que presentó el mayor número de clones tolerantes hasta concentraciones de 500 ppm de LSS y 1000 ppm de ASL, seguida de la Muestra 1, la Muestra 2 y por último la Muestra 3 quien presento el menor número de clones tolerantes a los diferentes tensoactivos evaluados, concluyendo que el tensoactivo ASL y LSS presentan similitud en su toxicidad frente al crecimiento bacteriano.

Los clones aislados sin presión selectiva de las diferentes Muestras evaluadas mostraron tener mayor crecimiento a una concentración de 500 ppm de LSS, seguido de ASL a concentraciones de 1000 ppm mientras que el Tensoactivo AC a una concentración de 500 ppm inhibió casi

totalmente el crecimiento microbiano, por lo que se considera que el tensoactivo AC es el más toxico seguido por el tensoactivo ASL y por último el tensoactivo LSS.

3.5. Determinación del comportamiento de los diferentes clones aislados de medios suplementados con Ácido sulfónico lineal, Amonio Cuaternario y sin presión selectiva frente a Petróleo 1000 $\mu\text{L}/100\text{mL}$.

La evaluación del efecto del petróleo sobre los clones aislados bajo las diferentes condiciones selectivas mostro un comportamiento variable (Gráfico 23-3, Gráfico 24-3, Gráfico 23-3 y Gráfico 25-3)

3.5.1. Evaluación del comportamiento de los clones aislados del medio MASL frente a Petróleo 1000 $\mu\text{L}/100\text{mL}$.

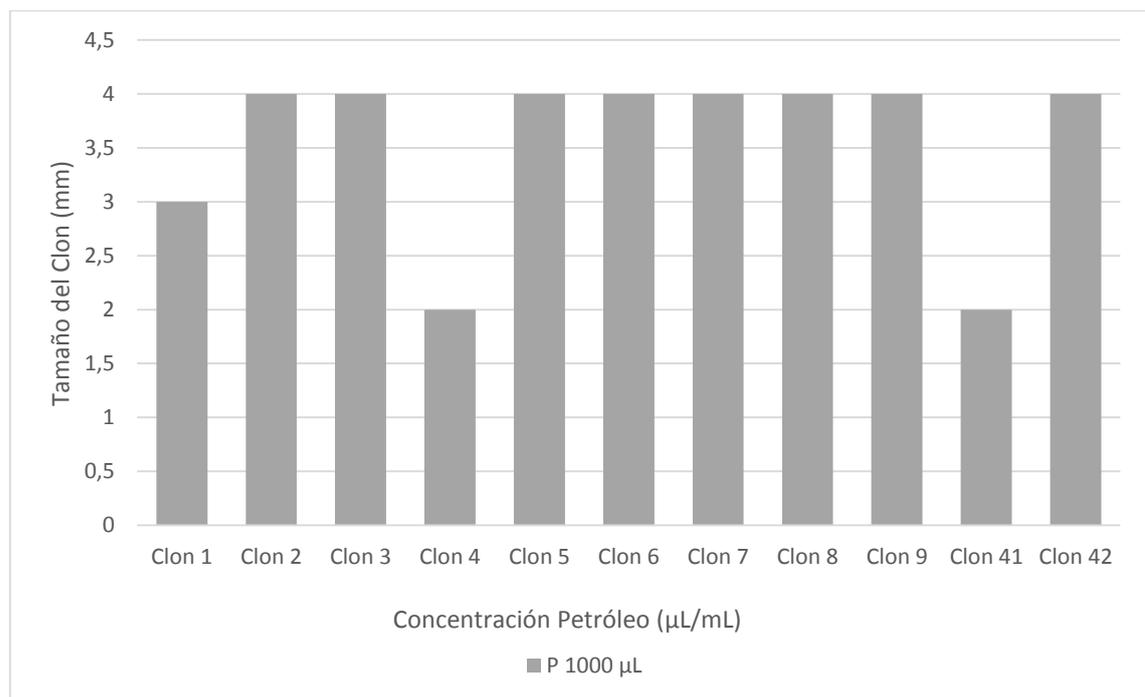


Gráfico 23-3: Crecimiento de los clones aislados de la Muestra 1 utilizando ASL como presión selectiva, en presencia de Petróleo 1000 $\mu\text{L}/100\text{mL}$.

Realizado por: Pérez Jeimy; 2018

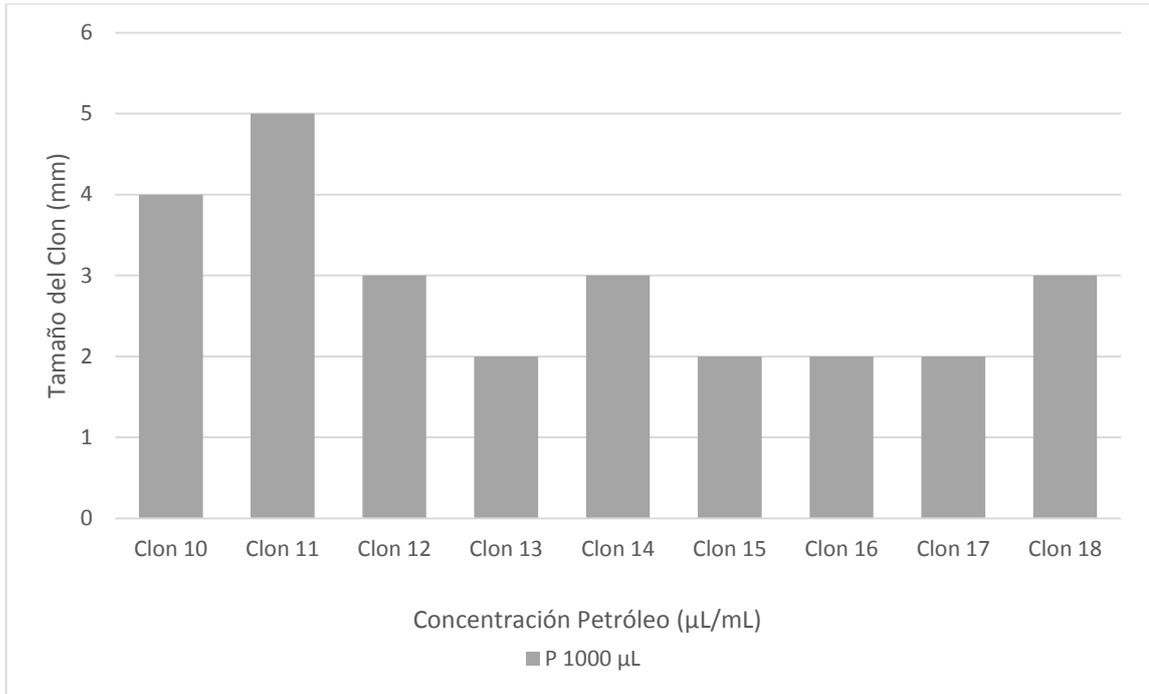


Gráfico 24-3: Crecimiento de los clones aislados de la Muestra 2 utilizando ASL como presión selectiva, en presencia de Petróleo 1000 µL/100mL.

Realizado por: Pérez Jeimy; 2018

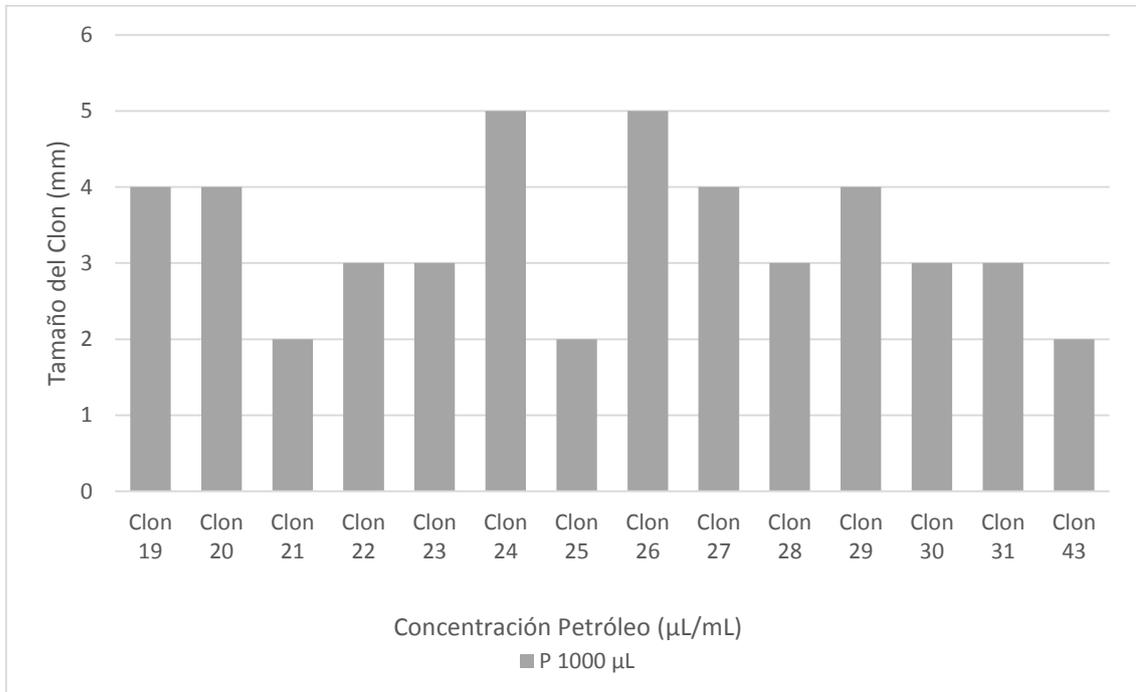


Gráfico 25-3: Crecimiento de los clones aislados de la Muestra 3 utilizando ASL como presión selectiva, en presencia de Petróleo 1000 µL/100mL.

Realizado por: Pérez Jeimy; 2018

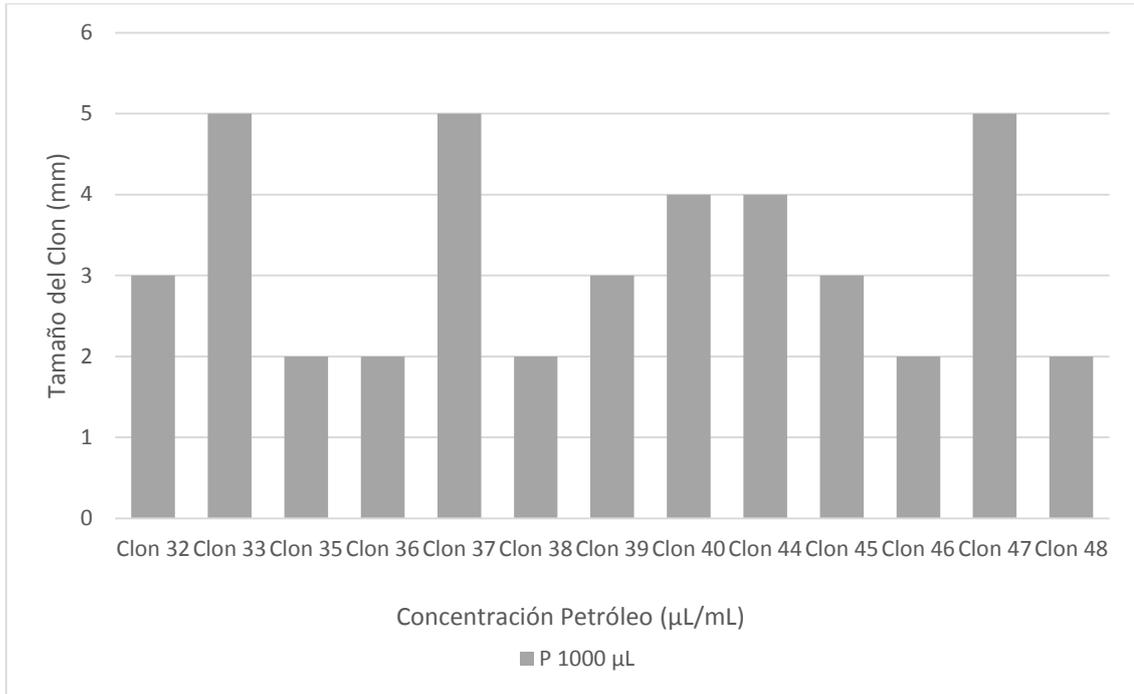


Gráfico 26-3: Crecimiento de los clones aislados de la Muestra 4 utilizando ASL como presión selectiva, en presencia de Petróleo 1000 µL/100mL.

Realizado por: Pérez Jeimy; 2018

En base a los resultados de los clones aislados de MASL, se estima que la Muestra 1 fue la que presentó el mayor número de clones tolerantes a Petróleo (1000 µL/100mL), seguida de la Muestra 4, la Muestra 3 y por último la Muestra 2, quien presento el menor número de clones tolerantes a P 1000 µL/100mL, concluyendo que todos los clones evaluados poseen la capacidad de crecimiento frente a un Hidrocarburo.

3.5.2. Evaluación del comportamiento de los clones aislados del medio MAC frente a Petróleo 1000 $\mu\text{L}/100\text{mL}$.

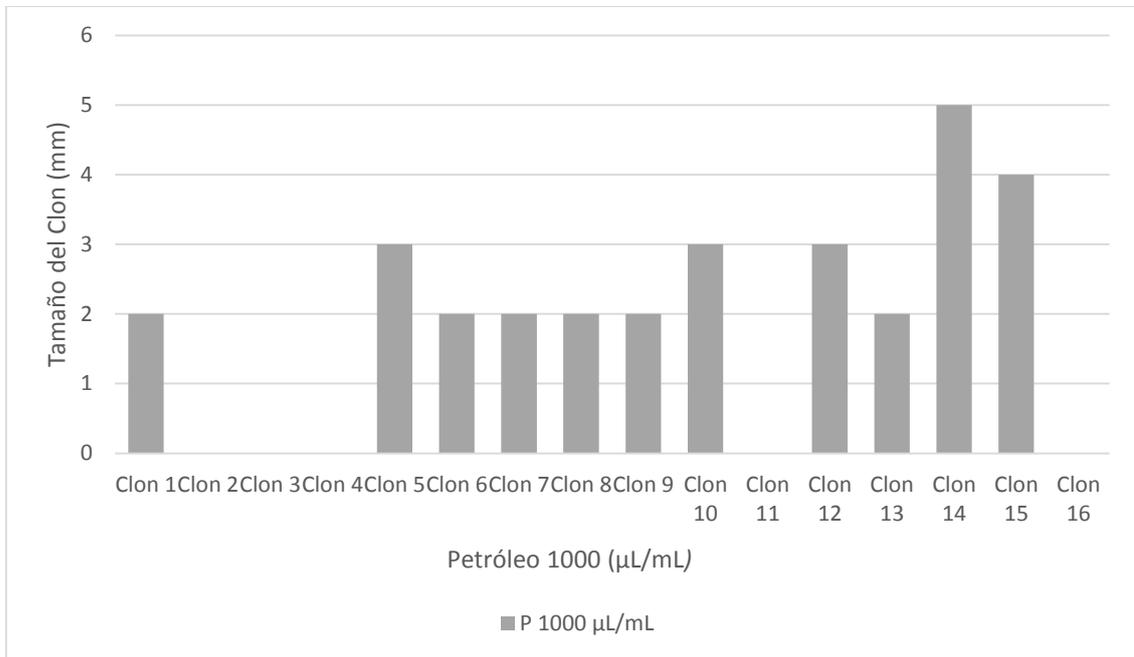


Gráfico 27-3: Crecimiento de los clones aislados de la Muestra 1 utilizando AC como presión selectiva, en presencia de Petróleo 1000 $\mu\text{L}/100\text{mL}$

Realizado por: Pérez Jeimy; 2018

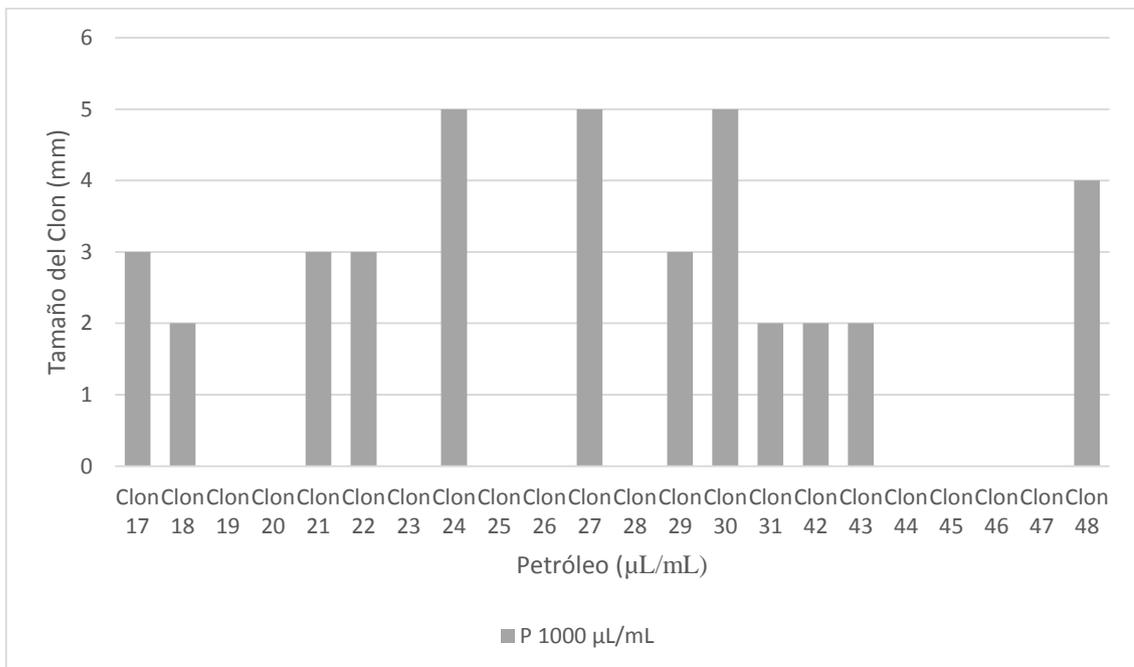


Gráfico 28-3: Crecimiento de los clones aislados de la Muestra 2 utilizando ASL como presión selectiva, en presencia de Petróleo 1000 $\mu\text{L}/100\text{mL}$

Realizado por: Pérez Jeimy; 2018

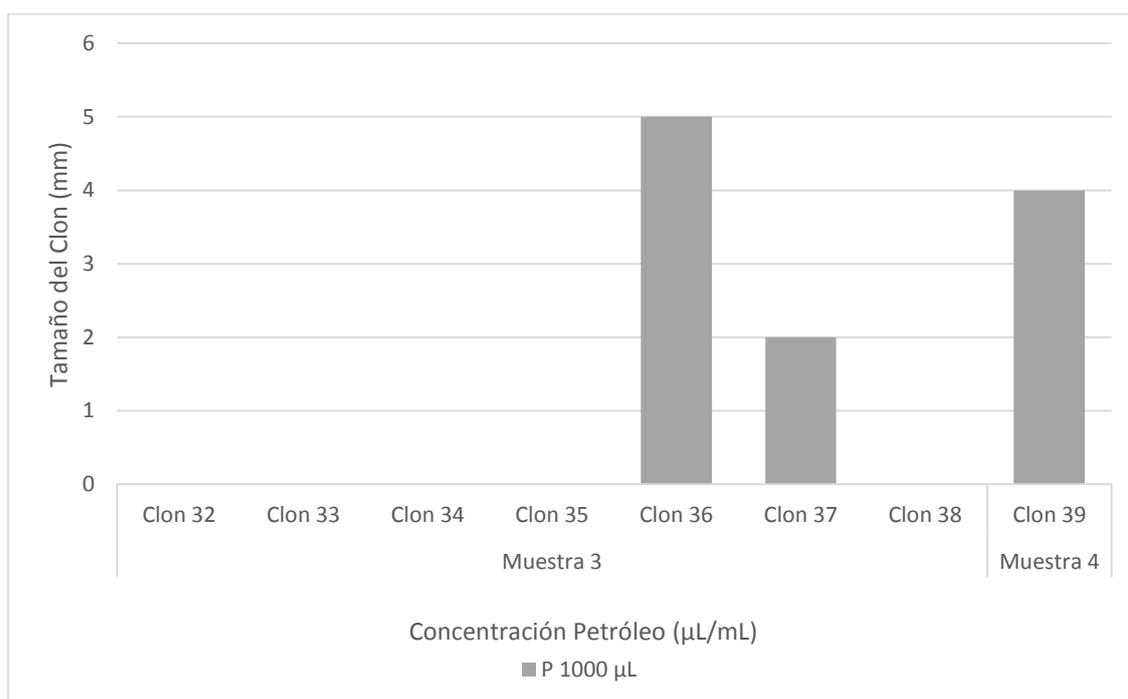


Gráfico 29-3: Crecimiento de los clones aislados de la Muestra 3 y Muestra 4 utilizando ASL como presión selectiva, en presencia de Petróleo 1000 µL/100mL.

Realizado por: Pérez Jeimy; 2018

Los Clones 2, 3, 4, 11, 16 pertenecientes a la Muestra 1; los Clones 19,20, 23, 25, 26, 44, 45, 46, 47, pertenecientes a la Muestra 2; los Clones 32, 33, 34, 35 y 38 pertenecientes a la Muestra 3, mostraron un bajo crecimiento a concentraciones de 1000 µL/100mL de Petróleo, por lo que se podría considerar que el Petróleo posee un efecto inhibitorio sobre los clones evaluados como se demuestra en el Grafico 29-3.

En base a los resultados de crecimiento obtenidos para los clones aislados utilizando Amonio Cuaternario, se estima que la Muestra 2 fue la que presentó el mayor número de clones tolerantes a Petróleo a una concentración de 1000 µL/100mL, seguida de la Muestra 1, la Muestra 3 y por último la Muestra 4, quien presento un solo clon tolerante a P 1000 µL/100mL

3.5.3. Evaluación del comportamiento de los clones aislados a partir del medio sin presión selectiva MSPS frente a Petróleo 1000 µL/100mL.

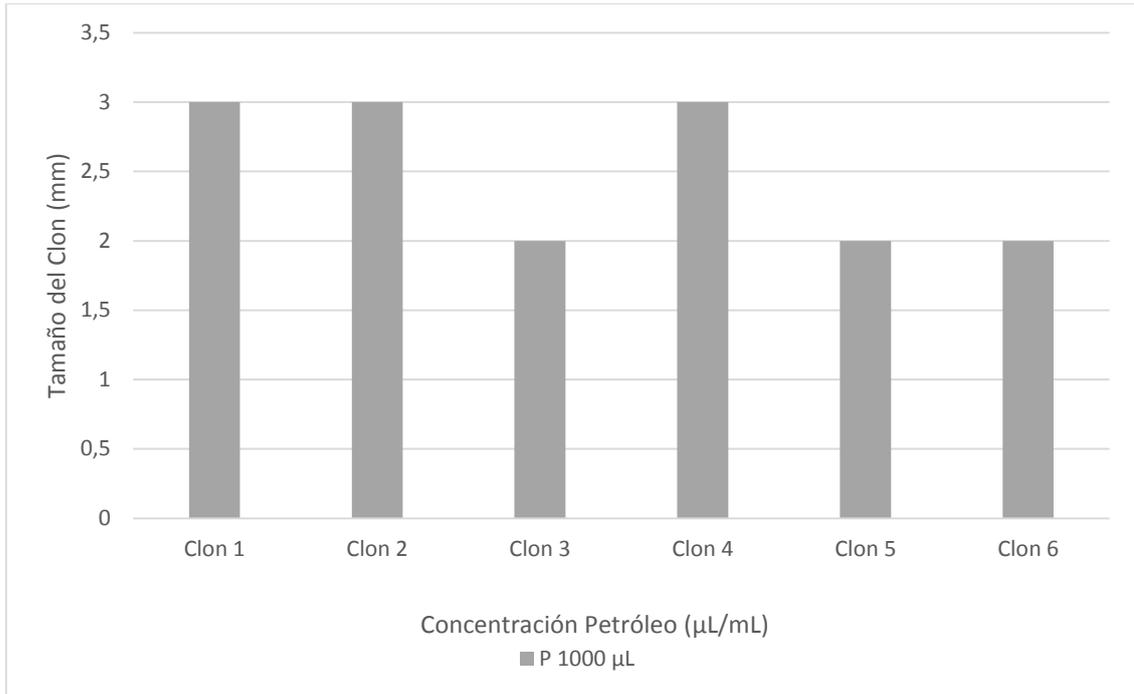


Gráfico 30-3: Crecimiento de los clones aislados de la Muestra 1 y utilizando un medio sin presión selectiva, en presencia de Petróleo 1000 µL/100mL

Realizado por: Pérez Jeimy; 2018

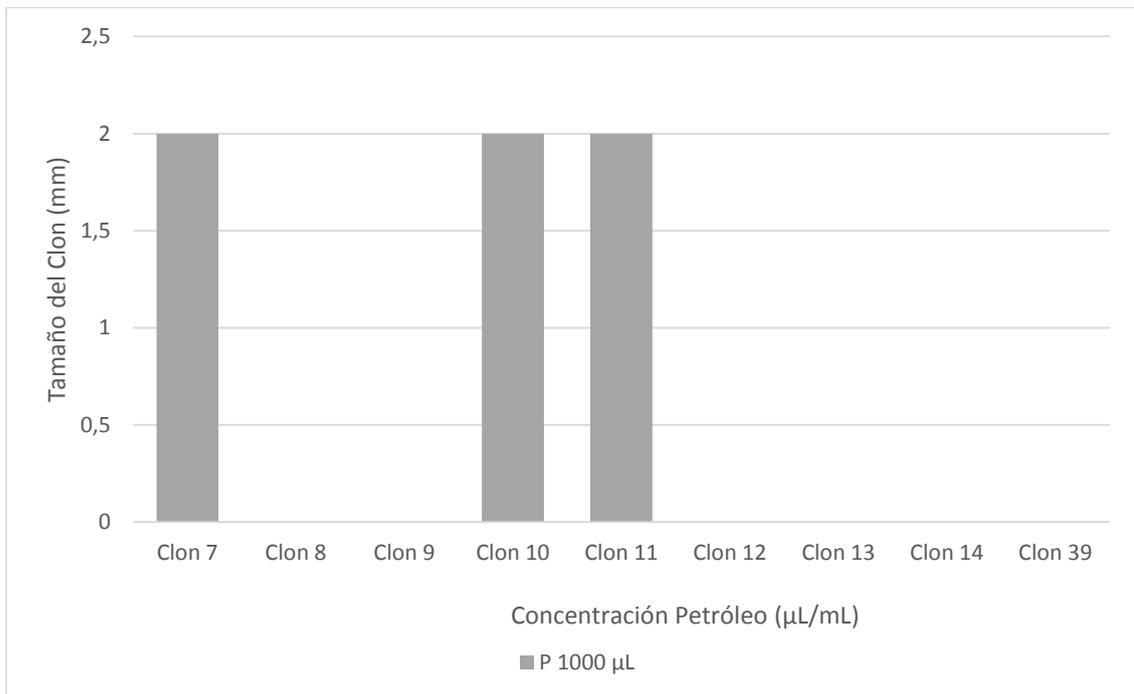


Gráfico 31-3: Crecimiento de los clones aislados de la Muestra 2 y utilizando un medio sin presión selectiva, en presencia de Petróleo 1000 µL/100mL

Realizado por: Pérez Jeimy; 2018

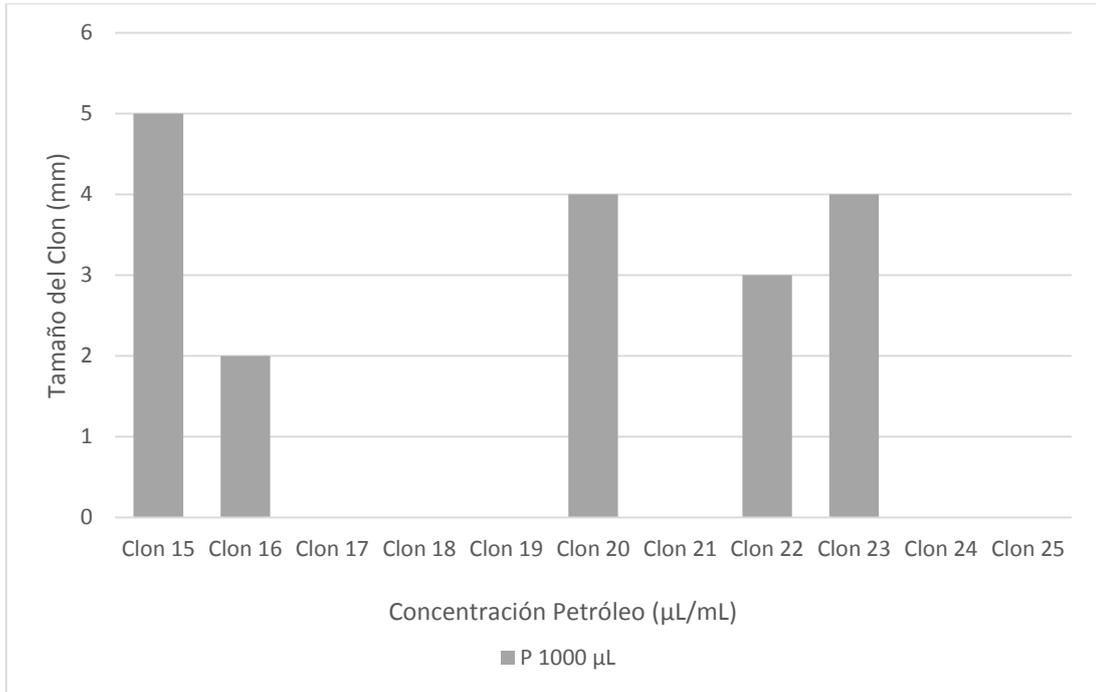


Gráfico 32-3: Crecimiento de los clones aislados de la Muestra 3 y utilizando un medio sin presión selectiva, en presencia de Petróleo 1000 µL/100mL

Realizado por: Pérez Jeimy; 2018

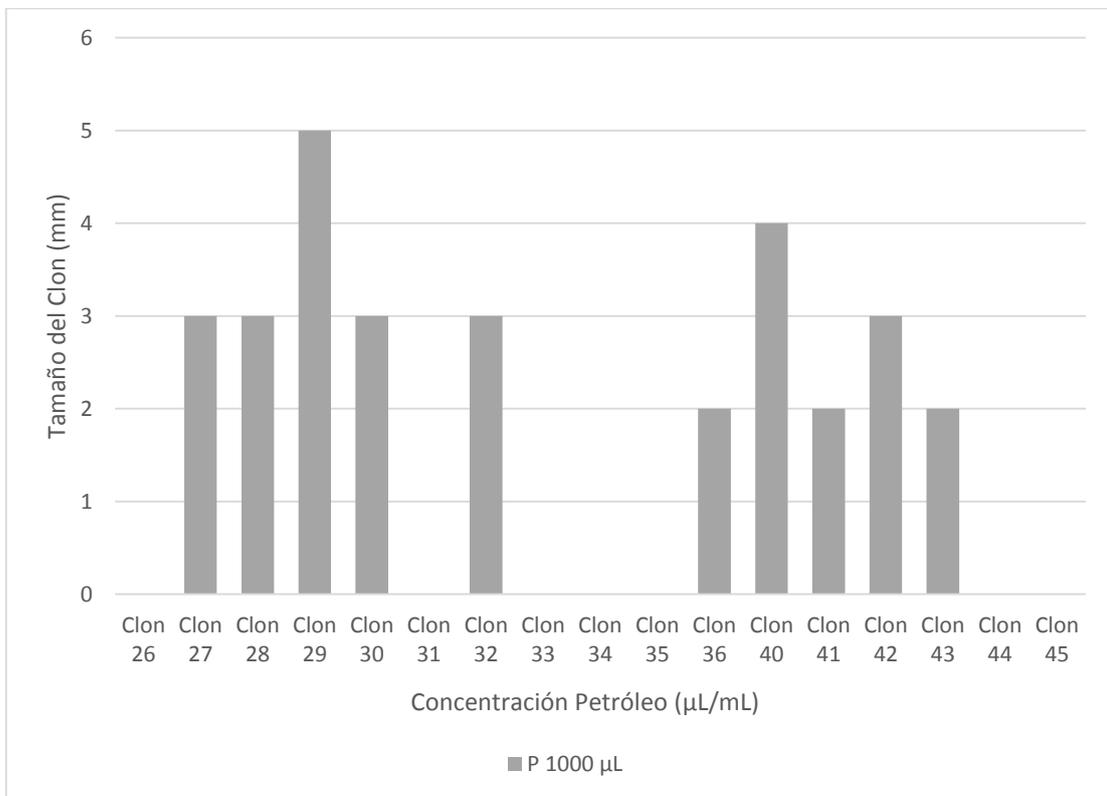


Gráfico 33-3: Crecimiento de los clones aislados de la Muestra 4 y utilizando un medio sin presión selectiva, en presencia de Petróleo 1000 µL/100mL

Realizado por: Pérez Jeimy; 2018

Los Clones 8, 9, 12, 13, 14, 39 pertenecientes a la Muestra 2 (Gráfico 31-3); los Clones 17, 18, 19, 21, 24, 25 pertenecientes a la Muestra 3 (Gráfico 32-3); los Clones 31, 33, 35, 44, 45 pertenecientes a la Muestra 4 (Gráfico 33-3), mostraron un bajo crecimiento microbiano, lo que indica que el Petróleo a una concentración de 1000 $\mu\text{L}/100\text{mL}$ es tóxico para estos clones.

El Clon 5 perteneciente a la Muestra 3 y el Clon 29 perteneciente a la Muestra 4, presentaron un mayor crecimiento a concentraciones de 1000 $\mu\text{L}/100\text{mL}$ de Petróleo, por lo tanto, resulta evidente que los clones evaluados en este estudio pueden presentar diferente sensibilidad frente a Petróleo.

Investigaciones realizadas por Chávez, et al., (2003, p. 4) durante el estudio de microorganismos aislados de la Bahía de la Habana mostró que la degradación o biotransformación de los hidrocarburos se produce por diversos mecanismos en el que se involucra complejos enzimáticos, muchos de ellos codificados por genes localizados en plásmidos

3.6. Evaluación de la producción de sustancias inhibitorias del crecimiento bacteriano en los clones aislados a partir de los medios MASL, MAC y MSPS frente Clon 6, Clon 29 y *E. coli*.

Tabla 17-3: Evaluación de la formación de halos de inhibición por Clones aislados del medio MASL, MAC y MSPS.

| Formación de halos de inhibición (FHI) | | | | |
|--|---------|--------|---------|-------------------------|
| Medio Cultivo | Clones | Clon 6 | Clon 29 | <i>Escherichia coli</i> |
| MASL | Clon 47 | - | + | - |
| MAC | Clon 7 | + | - | - |
| | Clon 17 | - | + | - |
| | Clon 31 | + | - | - |
| | Clon 48 | - | + | - |
| MSPS | Clon 42 | + | - | - |

Realizado por: Pérez Jeimy; 2018

Los resultados obtenidos para la formación de halos de inhibición en los clones evaluados (Tabla 17-3), nos permiten afirmar que, de los clones estudiados, seis (el Clon 47 aislado del medio MASL, los Clones 7, 17, 31, 48 aislados del MAC y el Clon 42 aislado del medio MSPS) poseen la capacidad de producir sustancias tóxicas contra bacterias ambientales. Becerra, et al., (2009, p.4), plantean que los halos de inhibición son generados por sustancias químicas con la capacidad de inhibir el crecimiento de otros microorganismos que algunos microorganismos han desarrollado como un mecanismo de defensa.

Ninguno de los clones mostro efecto inhibitorio sobre *Escherichia coli*, esto podría deberse según Becerra, et al., (2009, p. 2) a que este microorganismo ha desarrollado mecanismos de resistencia frente a muchos antibióticos, los cuales podrían darle protección ante las sustancias producidas por los clones evaluados

3.7. Evaluación de la capacidad del crecimiento en medio mineral Agar Bushnell Haas (Medio mínimo) suplementado con ASL 1050ppm, AC 500ppm y P 1000µL/100mL de clones aislados de los medios MASL, MAC y MSPS.

Con el fin de hacer una evaluación preliminar de la capacidad de utilizar como fuente de carbono y/o energía, los tensoactivos acido sulfónico lineal, amonio cuaternario y petróleo, se procedió a sembrar clones seleccionados en un medio mínimo (Agar Bushnell Haas) suplementado con tensoactivos y petróleo como única fuente de carbono, los resultados obtenidos se muestran en las Gráficas 34-3, Gráficas 35-3, Gráficas 36-3, Gráficas 37-3.

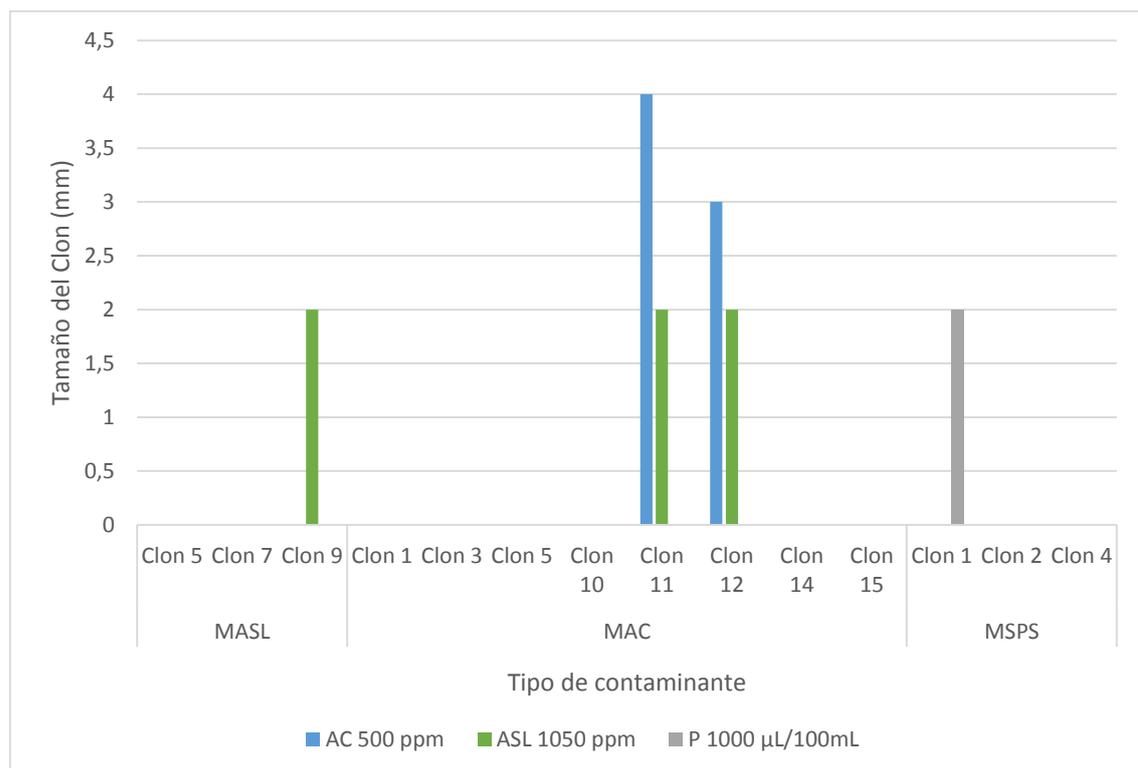


Gráfico 34-3: Evaluación del crecimiento de los clones aislados a partir de medios MASL, MAC y MSPS, procedentes de la Muestra 1 en Medio mínimo suplementado con AC 500 ppm, ASL 1050 ppm y Petróleo 1000 µL/100mL.

Realizado por: Pérez Jeimy; 2018

Los resultados obtenidos (Gráfico 34-3), muestran que solo cuatro de los clones evaluados, fueron capaces de crecer en medio mínimo suplementado (suplementos), haciéndose notar los Clones 11 y 12 aislados de medio suplementado con Amonio cuaternario, quienes mostraron crecimiento en medio mínimo suplementado con AC y ASL. Este resultado sugeriría que estos clones están utilizando estas sustancias como fuente de carbono y/o de energía.

El Clon 1 aislado del medio MSPS, fue el único capaz de crecer en presencia de Petróleo a una concentración de 1000 $\mu\text{L}/100\text{mL}$

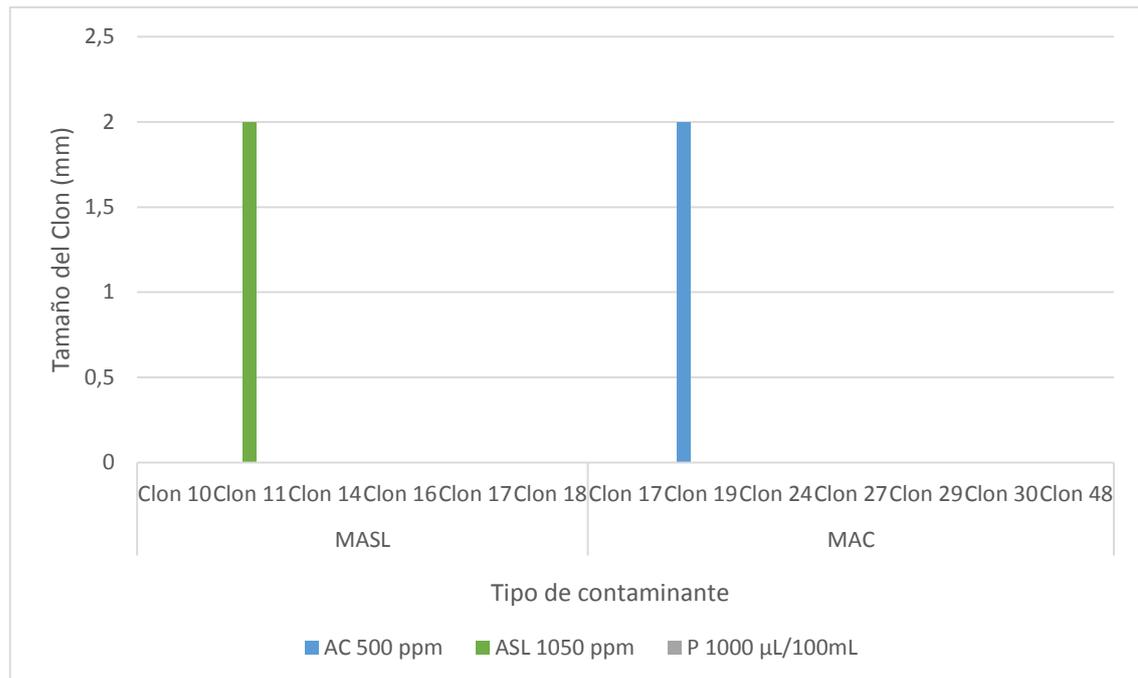


Gráfico 35-3: Evaluación del crecimiento de los clones aislados a partir de medios MASL, MAC, procedentes de la de la Muestra 2 en Medio mínimo suplementado con AC 500 ppm, ASL 1050 ppm y Petróleo 1000 $\mu\text{L}/100\text{mL}$.

Realizado por: Pérez Jeimy; 2018

Los resultados obtenidos (Gráfico 35-3), muestran que solo dos clones aislados de la muestra 2 fueron capaces de crecer en Medio mínimo suplementado con AC y ASL. El Clon 11 aislado de MASL mostro crecimiento en medio mínimo suplementado con ASL 1050 ppm y el Clon 19 aislado de MAC en medio mínimo suplementado con AC 500 ppm. Ninguno de los clones mostro crecimiento en el medio suplementado con Petróleo, 1000 $\mu\text{L}/100\text{mL}$.

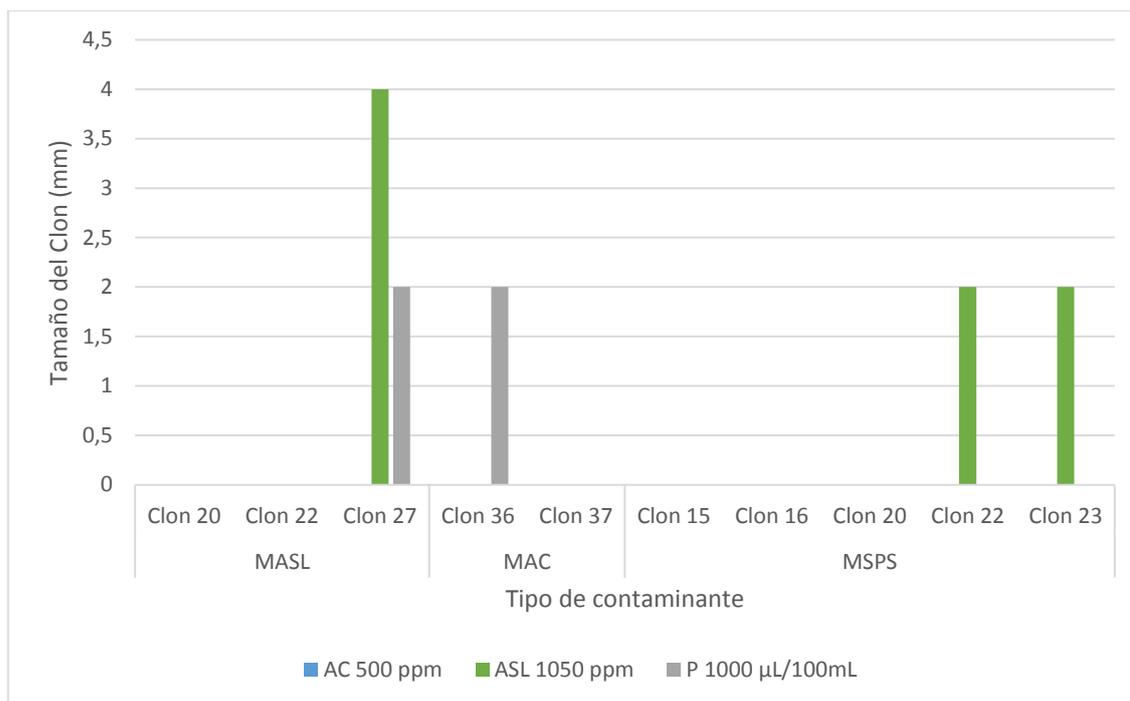


Gráfico 36-3: Evaluación del crecimiento de los clones aislados a partir de medios MASL, MAC y MSPS, procedentes de la de la Muestra 3 en Medio mínimo suplementado con AC 500 ppm, ASL 1050 ppm y Petróleo 1000 µL/100mL.

Realizado por: Pérez Jeimy; 2018

Los resultados obtenidos de la evaluación del crecimiento en medio mínimo suplementado con ácido sulfónico lineal, amonio cuaternario y petróleo de los clones aislados del medio MASL, MAC, MSPS (Gráfico 36-3), muestran que solo cuatro clones aislados de la muestra 3 (Clones 27, 22, 23, 36) fueron capaces de crecer en medio suplementado con ASL y Petróleo. El clon 27 aislado de MASL y los Clones 22, 23 aislados de MSPS, mostraron un crecimiento significativo en presencia de medio mínimo suplementado con ASL 1050 ppm, como se evidencia en el Gráfico 36-3, por ello, se podría considerar la posibilidad de que estos clones podrían poseer la capacidad de crecer utilizando ASL como fuente de carbono y/o energía, es de hacer notar que en nuestro caso la evaluación se realiza en un medio suplementado con 1050 ppm de ASL lo que está muy por encima de los 10 ppm reportados por Fernández, et al., (2014, p.6) durante el estudio de la capacidad de biodegradación de tensoactivos aniónicos utilizando consorcios microbianos aislados de sedimentos contaminados.

Alayo, et al., (2013, p.6) en un estudio de la biodegradabilidad de dodecibenceno sulfonato de sodio utilizando un cultivo puro de *P. aeruginosa*, evidencian que esta bacteria posee la capacidad de crecer en concentraciones de 100 ppm y utilizarlar este tensoactivo como unica fuente de carbono.

El clon 27 aislado de MASL y el Clon 36 aislados de MAC, mostraron un crecimiento significativo en un periodo de 72 horas en presencia de medio mínimo suplementado con Petróleo 1000 $\mu\text{L}/100\text{mL}$, por lo tanto, evidencian su elevada capacidad para tolerar Petróleo.

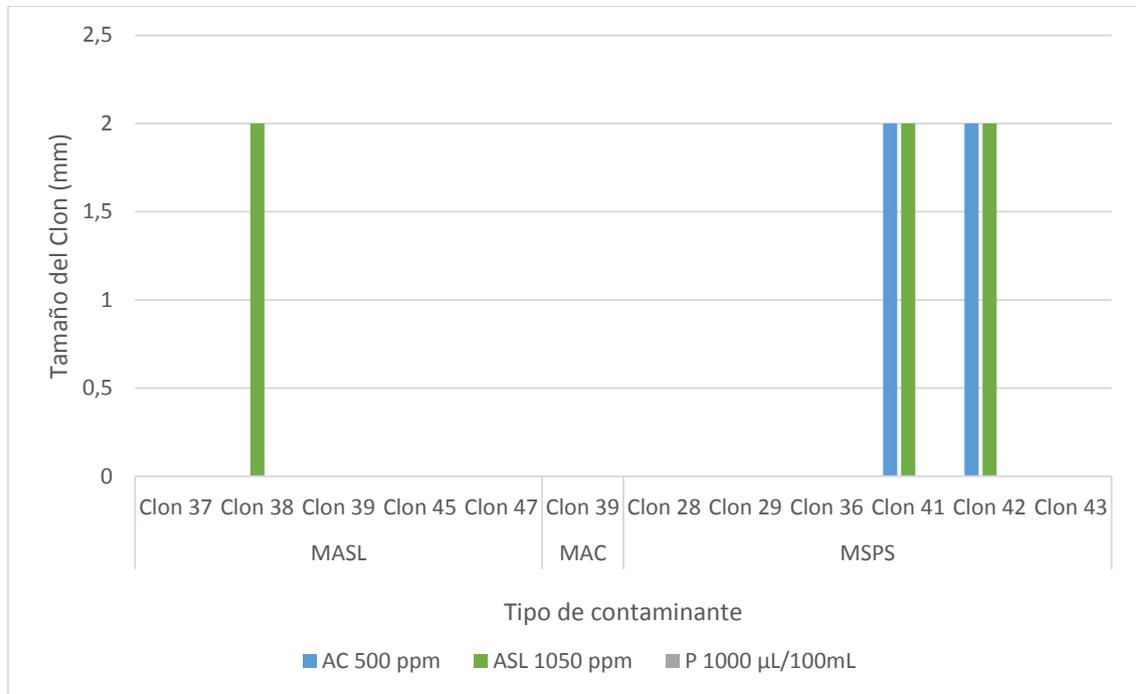


Gráfico 37-3: Evaluación del crecimiento de los clones aislados a partir de medios MASL, MAC y MSPS, procedentes de la de la Muestra 4 en Medio mínimo suplementado con AC 500 ppm, ASL 1050 ppm y Petróleo 1000 $\mu\text{L}/100\text{mL}$.

Realizado por: Pérez Jeimy; 2018

En base a los resultados obtenidos de la evaluación del crecimiento en medio mínimo suplementado con Ácido sulfónico lineal, Amonio cuaternario y Petróleo, de los clones aislados a partir de medios MASL, MAC y MSPS (Gráfico 37-3), muestran que solo tres clones aislados de la Muestra 4 (Clones 38, 41, 42) fueron capaces de crecer en medio suplementado con ASL y AC. Los Clones 41, 42 aislados de MSPS, mostraron un crecimiento significativo en presencia de medio mínimo suplementado con ASL 1050 ppm y AC 500 ppm, como se evidencia en el Gráfico 37-3, por ello, se podría considerar la posibilidad de que estos clones podrían poseer la capacidad de crecer utilizando ASL y AC como fuente de carbono y/o energía

Ninguno de los clones evaluados mostro crecimiento en el medio suplementado con Petróleo, 1000 $\mu\text{L}/100\text{mL}$.

Finalmente es importante indicar que el hecho de no tener un amplio conocimiento en los clones evaluados no quiere decir que estos microorganismos no tendrían la capacidad de mineralizar el tensoactivo, probablemente el tensoactivo no suministre los nutrientes óptimos para sustentar el desarrollo del clon, sin embargo, si se suministraría los nutrientes faltantes se podría obtener un mejor desarrollo del microorganismo.

CONCLUSIONES

- La evaluación *in situ* del pH y temperatura de las muestras, mostro que la temperatura promedio es de 20°C y el pH de 7.
- Se aislaron y caracterizaron clones microbianos presentes en el agua residual utilizando como elemento de selección su tolerancia a Ácido Sulfónico Lineal y Amonio Cuaternario, evidenciando que el AC presento el mayor efecto inhibitorio sobre la microbiota del agua residual induciendo una disminución en su crecimiento de un 99,9 %, mientras que el ASL muestra un efecto inhibitorio promedio del 48 %, tomando como control el crecimiento microbiano en el medio sin presión selectiva.
- Los resultados obtenidos de la Tinción de Gram, evidenciaron que utilizando el ASL como presión selectiva existió una preponderancia de los bacilos Gram negativos (73,3% Gram negativas y 26,7% Gram positivas) a diferencia de los clones aislados en presencia de Amonio Cuaternario que mostraron el 56% Gram negativas y 44% de bacterias Gram positivas, lo que podría deberse al efecto selectivo del Amonio Cuaternario, siendo similar a los resultados obtenidos de los clones aislados del medio sin presión selectiva (45% Gram negativas y 55% Gram positivas)
- La evaluación de la capacidad de crecimiento de los clones aislados en presencia de concentraciones crecientes de los tensoactivos mostro que poseen mayor tolerancia y desarrollo microbiano en los medios suplementados con Ácido Sulfónico Lineal a diferencia del medio suplementado con Amonio Cuaternario, el cual presento una elevada inhibición en el crecimiento bacteriano, lo que nos permite inferir que los efectos de los tensoactivos sobre la microbiota del agua son variados y que los tensoactivos catiónicos (AC) presentan mayor toxicidad que los aniónicos (ASL) y los aniónicos presentan mayor toxicidad que los no- iónicos.
- Los ensayos de tolerancia mostraron que los Clones 11 y 19 aislados de MASL fueron capaces de tolerar concentraciones de Ácido Sulfónico Lineal hasta 3500 ppm y los Clones 11 y 19 aislados de MAC concentraciones de Amonio Cuaternario hasta 1500 ppm.
- La evaluación del crecimiento en medio mínimo de clones seleccionados de las diferentes muestras, mostro que los clones 1, 9, 11, 12, provenientes de las Muestra 1 son capaces de crecer utilizando como fuente de carbono y/o de energía al Ácido sulfónico lineal,

Amonio Cuaternario y Petróleo; los Clones 11 y 19, provenientes de la Muestra 2 son capaces de crecer utilizando como fuente de carbono y/o de energía al Ácido sulfónico lineal y Amonio Cuaternario; los Clones 27, 36, 22, 23, provenientes de la Muestra 3 son capaces de crecer utilizando como fuente de carbono y/o de energía al Ácido sulfónico lineal y Petróleo; los clones 38, 41, 42 Provenientes de la Muestra 4, son capaces de crecer utilizando como fuente de carbono y/o de energía al Ácido sulfónico lineal y Amonio Cuaternario.

- El crecimiento mostrado por las bacterias presentes en las muestras de agua al ser cultivadas en medios suplementados con los tensoactivos Ácido sulfónico lineal y Amonio cuaternario, permite concluir que el Amonio Cuaternario fue el compuesto que presentó mayor toxicidad.

RECOMENDACIONES

- Realizar una evaluación con mayor profundidad de los diferentes clones aislados en esta investigación para determinar su capacidad para utilizar los tensoactivos como fuente de carbono y/o energía, de tal manera que puedan ser utilizados en procesos de biorremediación.
- Realizar la identificación hasta nivel de especie de los clones bacterianos más importantes en la presente investigación
- Ampliar los mecanismos de estudio sobre microorganismos con capacidad adaptativa y resistencia frente a condiciones adversas, con el fin de expandir el ámbito biotecnológico a nivel local y proyectar su aplicación de manera ambientalmente sostenible.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Acuña, Paola. y otros**, "Aislamiento e identificación de microorganismos del género *Methanococcus* y *Methanobacterium* de cuatro fuentes de Bogotá D.C". *NOVA - Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*, vol. 6, n°10 (2008), (Colombia) pp. 1-6.
2. **AGUA, ORG.**, *Contaminación del Agua por Detergentes*. [En línea] 2007. [Consulta: 18 Octubre 2018]. Disponible en: <https://agua.org.mx/biblioteca/contaminacion-del-agua-por-detergentes-eutrofizacion/>
3. **Aguilar, Diana.**, *Aislamiento de Microorganismos Productores de Biosurfactantes*. (tesis).(Maestría) Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo, Perú, 2013. pp. 1-69
4. **Aguirre, Javier.**, *Microorganismos en El Agua Residual*. [En línea] 2018. [Consulta: 1 Diciembre 2018] Disponible en: <https://es.scribd.com/doc/45116740/Microorganismos-en-El-Agua-Residual>.
5. **Alarcón, Luis. & Olivas, Evangelina.**, *Manual de practicas de Microbiología básica y Microbiología de alimentos. Programa de Nutrición*. 1^{ra} ed. Juarez - México. UACJ, 2001 pp 17, 18.
6. **Alayo, Erika. y otros**, "Crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* MBL-03 y degradación de tres concentraciones de Dodecibenceno Sulfonato de Sodio". *REBIOLEST*, vol.1, n°1 (2013), (Perú) pp. 1-7.
7. **Alba, Nathalia. & Araujo, Fanny.**, *Evaluación de los Desinfectantes utilizados en el proceso de Limpieza y Desinfección del área de Fitoterapeúticos en Laboratorios Pronabell Ltda.* [En línea] (tesis).(Maestría) Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia, 2008. pp. 1-99. [Consultado: 14 Noviembre 2018]. Disponible en: <https://javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis232.pdf>
8. **Anon.**, *Los Detergentes.* [En línea] 2014. [Consultado: 23 Noviembre 2018]. Disponible en: <https://los-detergentes.webnode.com>
9. **Arcos, Mireya., Ávila, Sara., Estupiñan, Sandra. & Gómez, Aura.**, "Indicadores microbiológicos de contaminación de las fuentes de agua". *NOVA - PUBLICACIÓN CIENTÍFICA*, [En línea], 2005, (Colombia) 3(4), pp. 1-11. [Consultado: 28 Noviembre 2018]. ISSN 1794-2470. Disponible en: http://www.unicolmayor.edu.co/invest_nova/NOVA/ARTREVIS2_4.pdf
10. **Arroyave, Ana., Cardona, Mariana. & Agudelo, Lina.**, "Identificación de cepas nativas con potencial para obtención de polihidroxicanoatos – (PHAs) en lodos activados". *Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, [En línea], 2013, (Colombia) 11(2), pp. 1-8. [Consultado: 12 Octubre 2018]. ISSN 1692-3561 Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v11nsp/v11nespa08.pdf>
11. **Becerra, Gerardo. y otros**, "Mecanismo de resistencia a antimicrobianos en bacterias". *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, vol.29, n°2 (2009), (México) pp. 1-7.
12. **Becerra, Lizzie. & Horna, María.**, "Aislamiento de microorganismos productores de biosurfactantes y lipasas a partir de efluentes residuales de camales y suelos

contaminados con hidrocarburos". *Scientia Agropecuaria*, [En línea], 2016, (Perú), 7(1), pp. 1-9. [Consultado: 24 Octubre 2018]. ISSN 2077-9917 Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2077-99172016000100003

13. **Bueno, Marisa., APLICACIÓN DE TENSIOACTIVOS A LA BIORRECUPERACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS POLICICLICOS AROMÁTICOS.** (tesis). (Posgrado) Instituto de Recursos naturales y Agrobiología de Sevilla, Sevilla, España: 2003. pp. 1-62
14. **Campuzano, Silvia., Camacho, Judith. & Alvarez, Alicia.,** "Caracterización del desecho tóxico producido en PYMES que fabrican detergentes". *Redalyc*, [En línea], 2006, (Colombia), 9(1), pp. 1-13. [Consultado: 14 Octubre 2018]. ISSN 0124-177X. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/1694/169421183006.pdf>
15. **Castro, Mariano., Dímeros de glucósidos : Una nueva familia de tensoactivos no iónicos biodegradables.** (tesis).(Maestría) Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina, 2000. pp.1-210
16. **Chávez, Gerson. y otros.,** "Aislamiento y caracterización de las fracciones neutras, ácidas y básicas de un crudo pesado y sus surfactantes naturales". *Técnica de la Facultad de Ingeniería Universidad del Zulia*, [En línea], 2003, (Venezuela), 26(3), pp. 2-14. [Consultado: 22 Octubre 2018]. ISSN 0254-0770 Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0254-07702003000300001
17. **Díaz, María., Espita, Sandra. & Molina, Francisco.,** *Digestión Anaerobia*. Primera ed. Bogotá: UNIBIBIOS, 2002, pp. 1-164
18. **Duarte, Fidencia. & Granados, Patricia.,** "Resistencia antimicrobiana de bacterias en un hospital de tercer nivel". *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, vol. 50, n°3 (2012), (México) pp. 1-13.
19. **Echevarria, Juan. & Iglesias, David.,** "Estafilococo Meticilino resistente, un problema actual en la emergencia de resistencia entre los Gram positivos". *Medica Heredia*, vol.14, n°4 (2003),(Perú) pp. 1-9.
20. **Forbes, Betty.,** *Diagnostico Microbiologico*. 12ª ed. Madrid – España: Editorial Médica Panamericana. 2009. pp. 226-213
21. **Fortunato, María., Rossi, Susana., Korol, Sonia. & Dáquino, Miguel.,** "Eficiencia de la Degradación Microbiana de Tensioactivos: Algunos Factores Condicionantes". *Acta Farnz. Bonaerense*, vol.2, n°17 (1997), (Argentina) pp. 1-5.
22. **GAD Municipal San Cristobal de Patate, MEJORAMIENTO Y AMPLIACIÓN DEL SISTEMA DE ALCANTARILLADO COMBINADO DEL CANTÓN PATATE.** Patate: s.n., 2016.
23. **Iannacone, José. & Alvariño, Lorena.,** "EFECTO DEL DETERGENTE DOMÉSTICO ALQUIL ARIL SULFONATO DE SODIO LINEAL (LAS) SOBRE LA MORTALIDAD DE TRES CARACOLAS DULCEACUÍCOLAS EN EL PERÚ". *Redalyc*, vol.1, n°1(2002), (Perú) pp. 1-8.

24. **Jover, Alejandro. & García, María. José.,** *Manual de Auxiliar de Farmacia Temaria General Modulo II. Farmacia Practica.* Primera ed. Sevilla- España: MAD. 2004. pp. 230-256
25. **Lechuga, M. y otros.,** "Influence of ozonation processes on the microbial degradation of surfactants". *Sciverse ScienceDirect*, vol.42, n°10 (2012), (España) pp. 1-6.
26. **López, Luis. y otros,** "Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología". *Investigación en Discapacidad*, vol.3, n°1 (2014), (México) pp. 1-9.
27. **Martínez, Carlos. & García, Alvaro.,** *Perímetros de protección para captaciones de agua subterránea destinada al consumo humano: metodología y aplicación al territorio..* Décima ed. Madrid – España: IGME, 2003, pp. 1-264.
28. **Martínez, Xochitl.,** *PRODUCCIÓN DE BIOSURFACTANTES POR MICROORGANISMOS AISLADOS DE SITIOS EXTREMOS Y CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS.* (tesis), (Pregrado) Instituto Politécnico Nacional, México: 2011, pp. 1-108
29. **Mencías, Emilio. & Mayero, Luis.,** *Manual de Toxicología Básica.* Primera ed, Madrid, España: Díaz de Santos S.A, 2000, pp. 18-300
30. **Molinao, Erreka.,** *MICROORGANISMOS PATÓGENOS DEL AGUA.* [En línea] [Consultado: 18 Noviembre 2018]. Disponible en: <http://www.laanunciataikerketa.com/trabajos/microorganismos/virus.pdf>
31. **Mollinedo, Marcela. & Gonzáles, Cynthia.,** "BACTERIAS GRAM NEGATIVA". *Actualización Clínica* , vol.49, n°1 (2014), (Bolivia) pp. 1-5.
32. **Motamedi, Hossein., Ardakani, Mohammad. & Mayeli, Nasim.,** "Isolation and screening of native polyhydroxyalkanoate producing bacteria from oil contaminated soils of Abadan refinery". *Biological Journal of Microorganism*, vol.3, n°12 (2015), (Irán) pp. 93- 104.
33. **Naheed, Nighat. & Jamil, Nazia.,** Optimization of biodegradable plastic production on sugar cane molasses in Enterobacter sp. SEL2. *Brazilian Journal of Microbiology. Lahore - Pakistán* , (2015) [En línea] 45(2), pp. 417-426. [Consultado: 08 Noviembre 2018] Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4166265/>
34. **Narváez, Silvia., Gómez, Martha. & Martínez, María.,** "SELECCIÓN DE BACTERIAS CON CAPACIDAD DEGRADADORA DE HIDROCARBUROS AISLADAS A PARTIR DE SEDIMENTOS DEL CARIBE COLOMBIANO". *Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras - INVERMAR*, vol. 37, n°1 (2008), pp. 1-16.
35. **Negroni, Marta.,** *Microbiología Estomatológica.* 2a ed ed. Buenos Aires – Argentina: Médica Panamericana. 2009. pp. 530-545
36. **Ortiz, Eudalys. y otros,** 2009. *Aislamiento, identificación y conservación de microorganismos de Ecosistemas Marinos.* [en línea]. La Habana- Cuba, [Consulta: 22 de Noviembre 2018]. Disponible en: <http://repositorio.geotech.cu/jspui/bitstream/1234/182/1/MICROORGANISMOS%20DE%20ECOSISTEMAS%20MARINOS.pdf>
37. **Puruncajas, Luis.,** Identificación de Bacterias benéficas mediante Cultivos Microbiológicos para el Tratamiento de Aguas Residuales en el sector la Calzada (Humedal) del Cantón Saquisilí, Provincia de Cotopaxi, 2013.(tesis), (Pregrado)

Universidad Técnica de Cotopaxi, Latacunga, Ecuador. 2013. pp 1-112. [Consulta: 4 de Diciembre 2018]. Disponible en: <http://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/2713/1/T-UTC-00249.pdf>

38. **Ramos, Raudel., Sepúlveda, Rubén. & Villalobos, Francisco.,** *El agua en el medio ambiente Muestreo y análisis*. Primera ed. México: Plaza y Valdés S.A de C.V., 2003, pp. 18-350
39. **Ramos, Yohanda., Casal, Ada. & Spengler, Beatríz.,** "Estudio de la obtención de emulsificantes catiónicos a partir del aceite de coco en la formulación de fluidos para la estimulación ácida de pozos de petróleo". *Redalyc*, vol.14, n°2 (2007), (México) pp. 1-7.
40. **Reese, E. & Maguire, Anne.,** "Surfactants as Stimulants of Enzyme Production by Microorganisms". *American Society for Microbiology*, vol.17, n°2 (1969), (Massachusetts) pp. 1-4.
41. **Ríos, Francisco.,** *Comportamiento Ambiental de Tensoactivos Comerciales: Biodegradabilidad, Toxicidad y Ozonización*. (tesis).(Doctoral) Universidad de Granada, Granada, España, 2014. pp. 1-259
42. **Riojas, Héctor. y otros,** "Efectos de los surfactantes en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos". *Química Viva*, [En línea], 2010, (Argentina) 1(3), pp. 1-27, [Consultado: 12 Noviembre 2018]. ISSN 1666-7948. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=86315692003>
43. **Rodríguez, Diego., Olivares, J. & Arece, J.,** "EVOLUCIÓN DE LOS PROTOZOOS". *Rev. Salud Anim*, vol.32, n°2 (2010), (Cuba) pp. 1-4.
44. **Rosero, Gladys. y otros,** "Producción de un tensoactivo biológico". *Instituto Colombiano de Biotecnología*, vol.4, n°1 (2001), (Colombia), pp. 1-7.
45. **Samaniego, Doris.,** *MANEJO ECOLÓGICO DEL SUELO COMO FUNDAMENTO DE LOS PROCESOS DE TRANSICIÓN HACIA LA AGROECOLOGÍA*, [En línea], Cuenca. [Consultado: 13 Diciembre 2018]. Disponible en: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/3244/1/Tesis.pdf>
46. **Sánchez, María.,** *Efectos Biológicos de los Sulfanatos de Alquilbenceno Lineales (LAS) en suelo Agrícola: Biotransformación y Estudios de Biodiversidad*. (tesis). (Doctoral) Universidad de Granada, Granada, España, 2007 pp.1-275
47. **Sibila, Miguel.,** *EVALUACIÓN DE LA BIODEGRADABILIDAD Y ECOTOXICIDAD DE TENSIOACTIVOS EN EL MEDIO ACUÁTICO MARINO*. (tesis). (Doctoral) Universidad de Cádiz, Cádiz, España, 2008. pp. 20-30. [Consulta: 17 de Octubre 2018]. Disponible en: http://minerva.uca.es/publicaciones/asp/tesis/sibila_lores.pdf
48. **Souza, Thaís. y otros,** "Chemical stability of a cold-active cellulase with high tolerance toward surfactants and chaotropic agent". *Biotechnology Reports*, vol.1, n°8 (2016), (Brazil) pp. 1-8.
49. **Tafur, José., Torres, Julian. & Villegas, María.,** "Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas". *Centro Internacional de Investigaciones Médicas*, vol.12, n°3 (2008), (Colombia) pp. 1-11.
50. **Tanzini, Marcel., Alves, Sérgio., Setten, Adriana. & Nilson, Augusto.,** "Compatibilidad de agentes tensoactivos con *Beauveria bassiana* y *Metarhizium*

anisopliae". *Dep. de Entomología, Fitopatología y Zoología Agrícola, ESALQ/USP*, vol.1 ,n°59 (2001), (Costa Rica) pp. 1-4.

51. **Torres, Darwin.**, *CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA DEL AGUA RESIDUAL DE LA PLANTA DE TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES (PTAR), UBICADA EN EL CAMPUS DE LA UNIVERSIDAD MILITAR NUEVA GRANADA- SEDE CAJICÁ* (tesis).(Posgrado) Universidad Militar Nueva Granada, Bogotá, Colombia, 2011. pp. 1-39
52. **Tortora, Gerard., Funke, Berdell. & Case, Christine.**, *Introducción a la Microbiología*. Novena ed. Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana S.A, 2007, pp. 10-500
53. **Troncoso, Claudia. y otros.**, "Implicancias Estructurales y Fisiológicas de la Célula Bacteriana en los Mecanismos de Resistencia Antibiótica." *Int. J. Morphol*, vol. 35, n°4 (2017), (Chile) pp. 1-10.
54. **TULSMA.**, *Texto Unificado de Legislación Secundaria del Ministerio del Ambiente. Libro VI- Anexo 1.* [en línea]. Quito- Ecuador: [Consulta: 22 de Octubre 2018]. Disponible en: <http://www.ambiente.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2018/05/TULSMA.pdf>
55. **Yépez, Carol.**, Remoción de Detergentes en Aguas Residuales Textiles empleando hongos seleccionados obtenidos a partir de efluentes de Industria Textil y Evaluación de su Tolerancia a metales pesados a nivel de Laboratorio. [En línea] (tesis), Escuela Politécnica del Ejército Quito- Ecuador: 2011. pp. 3-60 [Consulta: 22 de Octubre 2018]. Disponible en: <https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/4949/2/T-ESPE-033018.pdf>

ANEXOS

ANEXO A RESULTADOS ANALÍTICOS DE LAS AGUAS RESIDUALES DE LA PLANTA DE TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES DEL CANTÓN PATATE.

| Parámetros | Unidades | Entrada PTAR | Salida PTAR | Valor límite permisible (■) | Cumplimiento |
|--|----------------|--------------|-------------|-----------------------------|--------------|
| Demanda Química de Oxígeno | mg/ L | 168 | 146 | 200 | CUMPLE |
| Demanda Bioquímica de Oxígeno (5 días) | mg/ L | 80 | 70 | 100 | CUMPLE |
| Sólidos suspendidos | mg/ L | 60 | 66 | 130 | CUMPLE |
| Nitrógeno Amoniacal | mg/ L | >2,5 | >2,5 | 30 | CUMPLE |
| Nitrógeno Orgánico | mg/ L | 9,34 | 7,39 | - | |
| Grasas y Aceites | mg/ L | <2 | <2 | 30 | CUMPLE |
| Tensoactivos | | 10,8 | 22,2 | 0,5 | NO CUMPLE |
| Potencial Hidrógeno | Unidades de pH | 6,96 | 7,11 | 6-9 | CUMPLE |
| Sulfatos | mg/ L | 28 | 24 | 1000 | CUMPLE |
| Turbidez | UNT | 9,53 | 10,92 | - | |
| Coliformes Fecales | NMP/100 mL | 9200 | 5400 | 2000 | NO CUMPLE |

Fuente: GAD Municipal San Cristobal de Patate, 2016

ANEXO B TULSMA LIBRO VI, ANEXO 1 NORMAS DE DESCARGA DE EFLUENTES A UN CUERPO DE AGUA O RECEPTOR: AGUA DULCE Y AGUA MARINA

TABLA 12. Límites de descarga a un cuerpo de agua dulce

| Parámetros | Expresado como | Unidad | Límite máximo permisible |
|-----------------------------|--|--------|--------------------------|
| Nitrógeno Total Kjeldahl | N | mg/l | 15 |
| Organoclorados totales | Concentración de organoclorados totales | mg/l | 0,05 |
| Organofosforados totales | Concentración de organofosforados totales. | mg/l | 0,1 |
| Plata | Ag | mg/l | 0,1 |
| Plomo | Pb | mg/l | 0,2 |
| Potencial de hidrógeno | pH | mg/l | 5-9 |
| Selenio | Se | mg/l | 0,1 |
| Sólidos Sedimentables | | mg/l | 1,0 |
| Sólidos Suspendidos Totales | | mg/l | 100 |
| Sólidos totales | | mg/l | 1800 |
| Sulfatos | SO ₄ ²⁻ | mg/l | 1000 |
| Sulfitos | SO ₃ | mg/l | 2,0 |
| Sulfuros | S | mg/l | 0,5 |
| Temperatura | °C | mg/l | <35 |
| Tensoactivos | Sustancias activas al azul de metileno | mg/l | 0,5 |
| Tetracloruro de carbono | Tetracloruro de carbono | mg/l | 1,0 |
| Tricloroetileno | Tricloroetileno | mg/l | 1,0 |
| Vanadio | | mg/l | 5,0 |

Fuente: TULSMA, Anexo VI; 2015