



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

**“AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y ELABORACIÓN DE UN CONSORCIO
BACTERIANO PARA BIORREMEDIACIÓN DE AGUAS Y SEDIMENTOS
CONTAMINADOS PROVENIENTES DEL RESIDUAL DE LAS MUESTRAS
INGRESADAS AL LAB-CESTTA.”**

TESIS DE GRADO

Previo a la obtención del título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

AUTOR: JORGE LENIN MIRANDA FREIRE

TUTOR: Dra. NANCY VELOZ

Riobamba – Ecuador

2014

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

El Tribunal de Tesis certifica que: El trabajo de investigación: **“AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y ELABORACIÓN DE UN CONSORCIO BACTERIANO PARA BIORREMEDIACIÓN DE AGUAS Y SEDIMENTOS CONTAMINADOS PROVENIENTES DEL RESIDUAL DE LAS MUESTRAS INGRESADAS AL LAB-CESTTA.”**, de responsabilidad del señor egresado Jorge Lenin Miranda Freire ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal de Tesis, quedando autorizada su presentación.

NOMBRE	FIRMA	FECHA
Dra. Nancy Veloz DECANA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS	_____	_____
Ing. Fernanda Rivera DIRECTORA DE LA ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS	_____	_____
Dra. Nancy Veloz TUTOR TESIS	_____	_____
Dr. Roberto Erazo ASESOR DE TESIS	_____	_____
Dr. Fausto Yaulema MIEMBRO DEL TRIBUNAL	_____	_____
Abg. Bertha Quintanilla COORDINADORA SISIB-ESPOCH	_____	_____
NOTA DE TESIS ESCRITA	_____	

“Yo Jorge Lenin Miranda Freire soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta Tesis, y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado pertenecen a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo”.

Jorge Lenin Miranda Freire

AGRADECIMIENTO

Primeramente quiero agradecer a Dios Todopoderoso por darme salud y vida para continuar con este proyecto.

A mis padres Narciza de Jesús Freire, Jorge Humberto Miranda, por el apoyo brindado a lo largo de cada una de las etapas de mi carrera estudiantil.

A mis amigos que han estado siempre conmigo apoyándome y dándome ánimos para seguir a delante.

A la ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DE CHIMBORAZO, a la Facultad de Ciencias, a cada uno de sus profesores quienes con sus enseñanzas, y amistad impulsaron mi carrera.

De manera muy especial a la Dra. Nancy Veloz Directora de Tesis y al Dr. Roberto Erazo Asesor; por la confianza depositada para la realización de este trabajo.

Al personal del LAB-CESTTA por los consejos y apoyo brindados a lo largo del desarrollo de la investigación.

Jorge Miranda

DEDICATORIA

Dedico este trabajo de una manera muy especial a mis padres y mis hermanos que con su amor han sabido apoyarme a lo largo de mi vida estudiantil.

A todos mis queridos amigos que siempre han sido un apoyo en esta experiencia de la vida estudiantil.

Jorge Miranda

TABLA DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ii
ÍNDICE DE TABLAS.....	iii
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	v
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	vii
ÍNDICE DE ANEXOS.....	viii
RESUMEN.....	ix
SUMMARY.....	x
INTRODUCCIÓN.....	- 1 -
CAPÍTULO I.....	- 3 -
1. MARCO TEÓRICO.....	- 3 -
1.1. Biorremediación.....	- 3 -
1.2. Atenuación natural.....	- 5 -
1.3. Formación de consorcios.....	- 5 -
<i>1.3.1. Consorcios Definidos.....</i>	<i>- 5 -</i>
<i>1.3.2. Consorcios No Definidos.....</i>	<i>- 6 -</i>
1.4. Contaminantes.....	- 6 -
<i>1.4.1. Hidrocarburos Totales de Petróleo.....</i>	<i>- 6 -</i>
<i>1.4.2. Metales Pesados.....</i>	<i>- 7 -</i>
CAPITULO II.....	- 8 -
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	- 8 -
2.1. Lugar de la investigación.....	- 8 -
2.2. Materiales utilizados.....	- 8 -
<i>2.2.1. Agua contaminada.....</i>	<i>- 8 -</i>
<i>2.2.2. Sedimento Contaminado.....</i>	<i>- 8 -</i>
<i>2.2.3. Sustratos.....</i>	<i>- 9 -</i>
2.3. Toma de muestra.....	- 9 -
<i>2.3.1. Aguas.....</i>	<i>- 9 -</i>
<i>2.3.2. Sedimentos.....</i>	<i>- 9 -</i>
2.4. Metodología.....	- 9 -
2.5. Diseño experimental.....	- 10 -
<i>2.5.1. Tipo de diseño.....</i>	<i>- 11 -</i>
<i>2.5.2. Tratamientos.....</i>	<i>- 12 -</i>

2.5.3. <i>Parámetros de control</i>	- 13 -
2.5.4. <i>Parámetros de medición</i>	- 13 -
2.6. Métodos	- 13 -
CAPITULO III	- 15 -
3. PARTE EXPERIMENTAL	- 15 -
3.1. Procesamiento de muestras biológicas	- 15 -
3.1.1. <i>Materiales equipos y reactivos</i>	- 15 -
3.1.2. <i>Procedimiento</i>	- 16 -
3.2. Aislamiento y purificación de las cepas bacterianas	- 16 -
3.2.1. <i>Materiales equipos y reactivos</i>	- 17 -
3.2.2. <i>Procedimiento</i>	- 17 -
3.3. Caracterización macroscópica y microscópica de las cepas bacterianas	- 18 -
3.3.1. <i>Materiales Equipos Y Reactivos</i>	- 18 -
3.3.2. <i>Procedimiento</i>	- 19 -
3.4. Elaboración de bancos bacterianos primarios y secundarios	- 20 -
3.4.1. <i>Materiales, equipos y reactivos</i>	- 20 -
3.4.2. <i>Procedimiento</i>	- 20 -
3.5. Prueba de emulsificación	- 21 -
3.5.1. <i>Materiales, equipos y reactivos</i>	- 21 -
3.5.2. <i>Procedimiento</i>	- 22 -
3.6. Prueba de degradación de hidrocarburos	- 23 -
3.6.1. <i>Materiales equipos y reactivos</i>	- 23 -
3.6.2. <i>Procedimiento</i>	- 23 -
3.7. Prueba de antagonismo	- 24 -
3.7.1. <i>Materiales, equipos y reactivos</i>	- 24 -
3.7.2. <i>Procedimiento</i>	- 25 -
3.8. Prueba de reducción de metales	- 26 -
3.8.1. <i>Materiales equipos y reactivos</i>	- 26 -
3.8.2. <i>Procedimiento</i>	- 27 -
3.9. Muestreo en el laboratorio	- 27 -
3.10. Métodos analíticos	- 28 -
3.10.1. <i>Determinación de metales (Al, As, Ba, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Se)</i>	- 28 -
3.10.2. <i>Determinación de hidrocarburos totales de petróleo</i>	- 29 -
3.10.3. <i>Determinación de pH</i>	- 29 -
3.10.4. <i>Determinación de la humedad</i>	- 30 -

3.10.5.	<i>Determinación de temperatura</i>	- 30 -
3.10.6.	<i>Determinación de concentración bacteriana</i>	- 30 -
CAPITULO IV		- 31 -
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	- 31 -
4.1.	Elaboración de los consorcios bacterianos	- 31 -
4.2.	Prueba de emulsificación	- 32 -
4.3.	Prueba de degradación de hidrocarburos	- 33 -
4.4.	Prueba de antagonismo	- 33 -
4.5.	Prueba de identificación	- 34 -
4.6.	Prueba de reducción de metales en cada uno de los inóculos conformados	- 35 -
4.7.	Análisis de datos del diseño experimental	- 37 -
4.7.1.	<i>Obtención del sedimento sujeto a remediación con consorcios bacterianos</i>	- 37 -
4.7.2.	<i>Caracterización y parámetros de análisis del sedimento</i>	- 37 -
4.7.3.	<i>Análisis de Unidades de control</i>	- 38 -
4.8.	Seguimiento de las variables de control	- 50 -
4.8.1.	<i>Temperatura y humedad ambiental</i>	- 50 -
4.8.2.	<i>Temperatura y humedad en tratamientos de biorremediación</i>	- 51 -
4.8.3.	<i>pH en tratamientos de biorremediación</i>	- 52 -
4.8.4.	<i>Crecimiento bacteriano en tratamientos de biorremediación</i>	- 53 -
4.9.	Porcentaje de eficacia del proceso de biorremediación	- 55 -
CONCLUSIONES		- 56 -
RECOMENDACIONES		- 58 -
BIBLIOGRAFÍA		
ANEXOS		

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

Cd	Cadmio
Al	Aluminio
As	Arsénico
Ba	Bario
Cr	Cromo
Cu	Cobre
Hg	Mercurio
Ni	Níquel
Pb	Plomo
Se	Selenio
DBO₅	Demanda bioquímica de oxígeno
DQO	Demanda química de oxígeno
g	Gramos
mg/L	miligramos por litro
HPLC	High performance Liquid Chromatography
Kg	Kilogramo
pH	Potencial Hidrógeno
T1	Tratamiento 1
T2	Tratamiento 2
T3	Tratamiento 3
TPH's	Hidrocarburos Totales de Petróleo
U1	Unidad 1
U2	Unidad 2
U3	Unidad 3
°C	Grados Celsius

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1:	BIORREMEDIACIÓN.....	-3-
Figura 1-2:	DISPOSICIÓN DE TRATAMIENTOS Y UNIDADES EXPERIMENTALES.....	-12-

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-2:	MÉTODOS DE ANÁLISIS AGUAS.....	-13-
Tabla 2-2:	MÉTODOS DE ANÁLISIS SEDIMENTOS.....	-14-
Tabla 1-4:	CARACTERIZACIÓN MACRO Y MICROSCÓPICA DE LAS CEPAS.....	-31-
Tabla 2-4:	UNIDADES DE ACTIVIDAD EMULSIFICANTE DE LAS CEPAS.....	-32-
Tabla 3-4:	POBLACIÓN APROXIMADA DE MICROORGANISMOS DE ACUERDO A LA TURBIDEZ MEDIDA EN LA ESCALA MC. FARLAND.....	-33-
Tabla 4-4:	RESULTADOS DE LA PRUEBA DE ANTAGONISMO.....	-34-
Tabla 5-4:	IDENTIFICACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS.....	-35-
Tabla 6-4:	PRUEBA DE REDUCCIÓN DE METALES APLICANDO CONSORCIOS.....	-36-
Tabla 7-4:	CARACTERIZACIÓN DEL SEDIMENTO A TRATAR Y UNIDAD DE CONTROL SIN TRATAMIENTO.....	-38-
Tabla 8-4:	VARIACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ALUMINIO EN EL PROCESO DE REMEDIACIÓN.....	-39-
Tabla 9-4:	VARIACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ARSÉNICO EN EL PROCESO DE REMEDIACIÓN.....	-40-
Tabla 10-4:	VARIACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE BARIO EN EL PROCESO DE REMEDIACIÓN.....	-41-

Tabla 11-4:	VARIACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CADMIO EN EL PROCESO DE REMEDIACIÓN.....	-42-
Tabla 12-4:	VARIACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE COBRE EN EL PROCESO DE REMEDIACIÓN.....	-43-
Tabla 13-4:	VARIACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CROMO EN EL PROCESO DE REMEDIACIÓN.....	-44-
Tabla 14-4:	VARIACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE MERCURIO EN EL PROCESO DE REMEDIACIÓN.....	-45-
Tabla 15-4:	VARIACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE NÍQUEL EN EL PROCESO DE REMEDIACIÓN.....	-46-
Tabla 16-4:	VARIACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PLOMO EN EL PROCESO DE REMEDIACIÓN.....	-47-
Tabla 17-4:	VARIACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE SELENIO EN EL PROCESO DE REMEDIACIÓN.....	-48-
Tabla 18-4:	VARIACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE TPH EN EL PROCESO DE REMEDIACIÓN.....	-49-
Tabla 19-4:	pH EN LAS UNIDADES DE CONTROL DE LOS TRATAMIENTOS.....	-52-
Tabla 20-4:	CONTEO BACTERIANO EN LAS UNIDADES DE CONTROL DE LOS TRATAMIENTOS.....	-53-
Tabla 21-4:	PORCENTAJE DE EFICACIA DEL PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN EN EL T3.....	-55-

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-4:	LECTURA DE CONCENTRACIÓN DE ALUMINIO EN EL SEDIMENTO.....	-39-
Gráfico 2-4:	LECTURA DE CONCENTRACIÓN DE ARSÉNICO EN EL SEDIMENTO	-40-
Gráfico 3-4:	LECTURA DE CONCENTRACIÓN DE BARIO EN EL SEDIMENTO	-41-
Gráfico 4-4:	LECTURA DE CONCENTRACIÓN DE CADMIO EN EL SEDIMENTO.....	-42-
Gráfico 5-4:	LECTURA DE CONCENTRACIÓN DE COBRE EN EL SEDIMENTO.....	-43-
Gráfico 6-4:	LECTURA DE CONCENTRACIÓN DE CROMO EN EL SEDIMENTO	-44-
Gráfico 7-4:	LECTURA DE CONCENTRACIÓN DE MERCURIO EN EL SEDIMENTO.....	-45-
Gráfico 8-4:	LECTURA DE CONCENTRACIÓN DE NIQUEL EN EL SEDIMENTO.....	-46-
Gráfico 9-4:	LECTURA DE CONCENTRACIÓN DE PLOMO EN EL SEDIMENTO.....	-47-
Gráfico 10-4:	LECTURA DE CONCENTRACIÓN DE SELENIO EN EL SEDIMENTO.....	-48-
Gráfico 11-4:	LECTURA DE CONCENTRACIÓN DE TPH EN EL SEDIMENTO.....	-49-
Gráfico 12-4:	VARIACIÓN DE TEMPERATURA DURANTE LA INVESTIGACIÓN.....	-50-
Gráfico 13-4:	VARIACIÓN DE LA HUMEDAD DURANTE LA INVESTIGACIÓN.....	-50-
Gráfico 14-4:	TEMPERATURAS DE LAS UNIDADES EXPERIMENTALES.....	-51-
Gráfico 15-4:	PORCENTAJE DE HUMEDAD DE LAS UNIDADES EXPERIMENTALES.....	-52-

Gráfico 16-4:	pH EN LAS UNIDADES DE CONTROL DE LOS TRATAMIENTOS.....	-53-
Gráfico 17-4:	CRECIMIENTO BACTERIANO TRATAMIENTO 1.....	-54-
Gráfico 18-4:	CRECIMIENTO BACTERIANO TRATAMIENTO 2.....	-54-
Gráfico 19-4:	CRECIMIENTO BACTERIANO TRATAMIENTO 3.....	-54-

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1-3:	PREPARACIÓN DE CAJAS CON AGAR.....	-16-
Ilustración 2-3:	AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE CEPAS.....	-18-
Ilustración 3-3:	ADICIÓN DE REACTIVO EN EL PROCESO DE TINCIÓN.....	-19-
Ilustración 4-3:	OBSERVACIÓN DE PLACAS AL MICROSCOPIO.....	-19-
Ilustración 5-3:	ELABORACIÓN DE BANCOS SECUNDARIOS DE CEPAS.....	-21-
Ilustración 6-3:	PREPARACIÓN DE TUBOS PARA PRUEBA DE ACTIVIDAD EMULSIFICANTE.....	-22-
Ilustración 7-3:	COLOCACIÓN DE CRUDO PARA LA PRUEBA DE PODER DEGRADATIVO.....	-24-
Ilustración 8-3:	PREPARACIÓN DE CAJAS PARA PRUEBA DE ANTAGONISMO.....	-26-

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo A:	PREPARACIÓN Y PESAJE DE MEDIOS DE CULTIVO.....	-61-
Anexo B:	CAJA CON COLONIAS BACTERIANAS.....	-61-
Anexo C:	ESTERILIZACIÓN DE MEDIOS MÍNIMOS NUTRITIVOS.....	-62-
Anexo D:	INOCULACIÓN DE CEPAS.....	-62-
Anexo E:	AGITACIÓN DE LOS MEDIOS EN LA PRUEBA DE PODER DEGRADATIVO.....	-63-
Anexo F:	INCUBACIÓN DE MEDIOS CON CEPAS.....	-63-
Anexo G:	ELABORACIÓN Y ROTULACIÓN DE BANCOS PRIMARIOS Y SECUNDARIOS.....	-64-
Anexo H:	ALMACENAMIENTO DE BANCOS PRIMARIOS Y SECUNDARIOS.....	-64-
Anexo I:	INOCULACIÓN DE CEPAS EN PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE IDENTIFICACIÓN.....	-65-
Anexo J:	TOMA DE MUESTRAS DE SEDIMENTOS DE UNIDADES DE CONTROL.....	-65-
Anexo K:	LECTURA DE METALES EN EQUIPO ICP.....	-66-
Anexo L:	REGISTRO DE TEMPERATURAS DURANTE EL PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN.....	-67-
Anexo M:	REGISTRO DE HUMEDAD DURANTE EL PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN.....	-68-
Anexo N:	RESULTADOS DE LA PRUEBA DE IDENTIFICACIÓN.....	-69-
Anexo Ñ:	INFORMES DE RESULTADOS.....	-78-

RESUMEN

Se realizó la conformación de consorcios bacterianos nativos para biorremediar aguas y sedimentos contaminados generados en el laboratorio del centro de servicios técnicos y transferencia tecnológica ambiental (LAB-CESTTA). Se realizó la caracterización físico-química y microbiológica del sedimento y aguas, aislamiento y purificación de las cepas mediante técnicas de siembras sucesivas. Se efectuó la caracterización macroscópica y microscópica de las cepas, se procedió a realizar diferentes pruebas de selección: poder degradativo, antagonismo, identificación, y reducción de metales para y la masificación, el proceso se ejecutó para la obtención de los consorcios bacterianos nativos de los residuales de muestras de aguas y sedimentos generados en el LAB-CESTTA. Utilizando equipos como: Cámara de flujo laminar horizontal, autoclave, incubadora, plasma acoplado inductivamente (ICP), estufa, entre los principales. Al finalizar las pruebas de selección se obtuvo 9 cepas bacterianas que se agruparon en tres consorcios: A que estaba formado por cuatro cepas identificadas *Shigella serogroups A,B y C*, *Povidencia rustigianii*, *Morganella morgarii* biogp y *Xenorhabdus nematophilis*; B por cinco cepas identificadas *Enterobacter agglomerans complex*, *Shigella serogroups C*, *Xenorhabdus nematophilis*, *Proteus vulgaris* y *Xenorhabdus nematophilis*; A+B formado por todas las cepas. En función a las pruebas de reducción de contaminantes realizadas en los sedimentos generados en el LAB-CESTTA se seleccionó al consorcio A+B como el más efectivo por presentar porcentajes más altos de reducción de contaminantes; TPH 96,14 %, Cd 64,90 % Se 56,94 %, Cu 55,49%, Cr 52,08 %, Ni 48,92 %, As 41,87 %, Al 44,13 %, Pb 37,86 %, Ba 36,07 %. Se recomienda hacer mayores estudios orientados a la reducción de metales pesados y otros contaminantes mediante la obtención de consorcios bacterianos nativos para reducir los impactos ambientales generados al ser estos depositados en el recurso suelo.

SUMMARY

It was made the conformation of native bacterial organizations, for bio-remediating water and polluted sediments generated in the Centro de servicios técnicos y transferencia tecnológica ambiental (LAB-CESTTA). It was made the characterization of physical-chemical and microbiological of the sediment and water, isolation and purifying of the strains by using techniques of successive sowing. It was made the macroscopic and microscopic characterization of the strains, it was proceeded to make different test of selection: degrading power, antagonism, identification and reduction of metal for massiveness, the process was executed for obtaining the native bacterial strains CESTTA. Thought equipment such as: horizontal camera of laminar flow, auto key, incubator, plasma coupled inductively (ICP), stove, among the main ones. At the end of the test of selection was obtained 9 bacterial strains that were united into three organizations: A that was formed by 4 identified strains: *Shigella serogroups A,B and C*, *Povidencia rustigianii*, *Morganella morgarii* biogp and *Xenorhabdus nematophilis*; B by 5 identified strains: *Enterobacter agglomerans complex*, *Shigella serogroups C*, *Xenorhabdus nematophilis*, *Proteus vulgaris* and *Xenorhabdus nematophilis*; A+B formed by all the strains. In function to the reduction profs of polluters made in the sediments generated in the LAB-CESTTA, it was selected to the organization A+B as the most effective to present highest percentages of reduction of polluters; ; TPH 96,14 %, Cd 64,90 % Se 56,94 %, Cu 55,49%, Cr 52,08 %, Ni 48,92 %, As 41,87 %, Al 44,13 %, Pb 37,86 %, Ba 36,07 %. It is recommended to make bigger studies oriented to the reduction of heavy metals and other polluters by using the obtaining of native bacterial organizations to reduce the environmental shocks generated at the moment of being these placed in the resource ground.

INTRODUCCIÓN

El uso de bacterias para la remediación de contaminantes ha sido ampliamente estudiado y difundido, llegando a comercializarse en muchos casos inóculos bacterianos que se asegura funcionan en cualquier ambiente, esto no siempre es cierto ya que la mayoría de bacterias necesitan ciertas condiciones para su crecimiento y desarrollo. Por esta razón en el área de biotecnología ambiental se realizan procesos continuos de investigación en busca de nuevas alternativas para la solución de los problemas de contaminación actuales de nuestro país de manera eficiente y amigable con el ambiente mediante el uso de consorcios bacterianos nativos, esta tesis de investigación forma parte de este esfuerzo; ya que tiene como objetivo obtener un consorcio bacteriano nativo capaz de reducir la concentración de los contaminantes más nocivos presentes en los sedimentos provenientes de la planta de tratamiento del LAB-CESTTA como son los metales pesados e hidrocarburos totales de petróleo.

La biorremediación es un conjunto de métodos que utilizan organismos (como bacterias, plantas, hongos, etc.) o productos de ellos para degradar contaminantes orgánicos peligrosos o convertir contaminantes inorgánicos en compuestos ambientalmente menos tóxicos o no tóxicos.

Uno de estos métodos es la bioaumentación o proceso por el cual se adiciona microorganismos seleccionados a un medio contaminado con fines de remediación. El método tradicional para realizar este proceso es adicionar directamente al sedimento el inóculo líquido y mediante volteo lograr la distribución del consorcio bacteriano por todo el tratamiento biológico. La técnica de biorremediación propuesta para esta investigación es bioaumentación aplicando consorcios bacterianos nativos obtenidos a partir de las aguas residuales y sedimentos generados en la planta de tratamiento del LAB-CESTTA para reducir los niveles de contaminación de la descarga de la planta y de los residuales de las muestras que ingresan al laboratorio.

Las características de los consorcios bacterianos nativos obtenidos permiten una mayor degradabilidad de compuestos orgánicos como hidrocarburos totales de petróleo, aceites y grasas y la reducción de compuestos inorgánicos probados a escala de laboratorio.

El Centro de Servicios Técnicos y Transferencia Tecnológica Ambiental (CESTTA) se ha destacado en el área ambiental por ser pionero en la transferencia de tecnología en busca de dar soluciones a los problemas ambientales actuales de nuestro país, por lo que ha desarrollado ya en su experiencia varios proyectos de biorremediación de suelos contaminados principalmente con hidrocarburos en la región amazónica a gran escala, a la par ha realizado varias investigaciones en el laboratorio para la reducción de contaminantes peligrosos como son los metales pesados obteniendo excelentes resultados, tal es así que se realizan estudios para la aplicación de consorcios bacterianos nativos para la remediación de los sedimentos contaminados de la planta de tratamiento del LAB-CESTTA.

Objetivos

General

Conformar consorcios bacterianos nativos para biorremediar aguas y sedimentos contaminados generados en el LAB-CESTTA.

Específicos

- ✓ Caracterizar física, química y microbiológicamente las aguas y sedimentos contaminados.
- ✓ Aislar, seleccionar e identificar las cepas existentes en las muestras de aguas y sedimentos contaminados
- ✓ Probar distintos inóculos bacterianos.
- ✓ Verificar el porcentaje de reducción de metales que presenta cada consorcio bacteriano nativo en el medio mínimo nutritivo a nivel de laboratorio.
- ✓ Medir el porcentaje de eficacia del consorcio bacteriano con mayor reducción de contaminantes.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Biorremediación

La biorremediación es aquella tecnología que se basa en la utilización de la capacidad metabólica que poseen los microorganismos tales como bacterias, hongos y levaduras para convertir contaminantes orgánicos en compuestos más simples y poco contaminantes, de esta forma se pueden utilizar para limpiar aguas o suelos contaminados (SANCHEZ, J., 2010).

Figura 1-1: BIORREMEDIACIÓN



Fuente: http://ingenierosdeminas.org/docu/documentos/fundamentos_%20biorremediacion.pdf

Algunos de los aspectos más importantes a tomar en consideración incluyen la biodegradabilidad, la distribución del contaminante en las distintas fases, el potencial de lixiviación, la reactividad química de los contaminantes, el tipo y propiedades del suelo la disponibilidad de oxígeno y la presencia o ausencia de sustancias inhibitoras. La utilización de la capacidad de degradación que poseen los microorganismos es la base fundamental de los tratamientos biológicos de contaminaciones orgánicas (CASTELLS, X., 2009). En resumen, el conocimiento de las características fisiológicas y bioquímicas así

como de la ecología y genética de las especies o consorcios microbianos involucrados, es un requisito importante, junto con el conocimiento de la naturaleza del emplazamiento y la elección de un procedimiento adecuado, para lograr el objetivo de dichos tratamientos (SANCHEZ, J., 2010).

Los tratamientos de biodescontaminación se fundamentan en la acción de microorganismos o plantas sobre los productos contaminantes. Los contaminantes tratados regularmente por estos métodos son los compuestos orgánicos volátiles y semivolátiles no halogenados y los derivados del petróleo. Cuando la contaminación incluye altas concentraciones de metales, compuestos orgánicos con alta proporción de cloro o sales inorgánicas, la eficacia del tratamiento disminuye debido a la toxicidad microbiológica de estos compuestos. La biotecnología ofrece buenas perspectivas para descontaminar los efluentes industriales. Los microorganismos pueden ser modificados para producir determinadas enzimas que ayuden a metabolizar los compuestos producidos como consecuencia de la actividad industrial y que son tóxicos para otro tipo de organismos. Además, se pueden diseñar rutas metabólicas alternativas para la biodegradación de residuos complejos (MORENO, M., 2004).

Los procesos biológicos para tratar compuestos tóxicos se plantean y compiten en términos de economía y eficiencia, ya que estos procesos tienen algunas ventajas como bajo consumo de energía, requieren inversiones de capital moderadas o bajas a más de ser ambientalmente seguros y no generan residuos. Existen microorganismos capaces de metabolizar productos como combustibles o disolventes, que constituyen un riesgo para la salud humana y para los ecosistemas en los que son vertidos. Una vez que los contaminantes son degradados, la población microbiana decrece, al consumirse lo que constituía su fuente nutritiva (MORENO, M., 2004). El principal objetivo de la recuperación biológica es lograr una alta destoxificación de ambientes contaminados mediante la creación de condiciones ambientales óptimas para que los microorganismos puedan realizar este proceso.

En caso de que el ecosistema contaminado no presente la actividad biológica requerida se pueden incorporar microorganismos de otra procedencia siempre y cuando estos

hayán sido probados y evaluados con anterioridad. El uso de microorganismos no está restringido únicamente al tratamiento de compuestos orgánicos. Existen casos en la que los organismos seleccionados pueden también reducir los cationes tóxicos de los metales pesados, a sus formas elementales menos solubles y menos tóxicas. Por lo tanto, el tratamiento biológico puede también aplicarse a las aguas superficiales contaminadas por metales pesados (MORENO, M., 2004).

1.2. Atenuación natural

La atenuación natural se puede definir como un conjunto de procesos físicos, químicos y biológicos, que ocurren de manera natural en un espacio determinado, con posterioridad a la aparición de la contaminación en el mismo. En condiciones favorables, la atenuación natural reduce, sin la intervención humana, la masa, la toxicidad, la movilidad, el volumen o la concentración de contaminantes en suelo o agua subterránea. Este proceso de atenuación natural se produce por una serie de mecanismos tales como dispersión, dilución adsorción, volatilización, estabilización y transformación o destrucción de contaminantes por vía ya sea esta química o biológica (SANCHEZ, J., 2010).

1.3. Formación de consorcios

1.3.1. Consorcios Definidos

Los consorcios definidos son aquellos que están bien caracterizados y son repetitivos pero tienen algunas desventajas ya que se necesitaría un gran número de cepas distintas para conseguir una degradación extensa del crudo de petróleo por ejemplo, debido a la gran cantidad de componentes presentes y al espectro metabólico limitado que posee una cepa bacteriana (JOSEPH, G., COLWELL, L., COLWELL, R., 1990).

Otra desventaja que podemos encontrar en los consorcios definidos es la posible formación de metabolitos intermediarios que sean tóxicos para la misma cepa o para otras cepas existentes en el mismo. De hecho, se ha descrito que durante la degradación

de mezclas de hidrocarburos se pueden formar intermediarios de persistencia y toxicidad desconocidas, por fenómenos de cometabolismo (NIELSEN, A., ALLARD, A, 2011).

1.3.2. Consorcios No Definidos

Los consorcios no definidos, especializados en la degradación de hidrocarburos u otros contaminantes, se obtienen a partir de enriquecimientos de muestras ambientales donde hayan existido episodios previos y recurrentes de contaminación. El resultado es la obtención de una población microbiana con una mayor eficiencia en la degradación de compuestos conocidos y desconocidos presentes en ecosistemas o residuos contaminados en comparación con un consorcio definido. Por lo tanto, es más probable que en un consorcio no definido se hayan seleccionado degradadores de productos finales que se acumulan como resultado de procesos cometabólicos (NIELSEN, A., ALLARD, A, 2011).

1.4. Contaminantes

1.4.1. Hidrocarburos Totales de Petróleo

Los hidrocarburos totales de petróleo (TPH) son una mezcla de productos químicos compuestos principalmente de carbono e hidrógeno, los científicos han dividido a los TPH en grupos de hidrocarburos de petróleo que se comportan en forma similar en el suelo o en el agua estos grupos se llaman fracciones de hidrocarburos de petróleo, cada fracción contiene muchos productos químicos individuales.

Algunas sustancias químicas que pueden encontrarse en los TPH incluyen a hexano, combustibles de aviones de reacción, aceites minerales, benceno, tolueno, xilenos, naftalina y fluoreno, como también otros productos de petróleo y componentes de gasolina sin embargo es probable que muestras de TPH contengan solamente algunas o una mezcla de estas sustancias químicas (CASTELLS, X., 2009).

1.4.2. Metales Pesados

Un metal pesado en el campo ambiental son todos aquellos elementos metálicos o metaloides, de mayor o menor densidad, que aparecen frecuentemente asociados a problemas de contaminación. Algunos de ellos son esenciales para los organismos en pequeñas cantidades, como el Fe, Mn, Zn, B, Co, As, V, Cu, Ni o Mo, y se vuelven nocivos cuando se presentan en concentraciones elevadas, mientras que otros no desempeñan ninguna función biológica y resultan altamente tóxicos, como el Cd, Hg y el Pb. Estos elementos tienen su origen en el substrato litológico, apareciendo bien como elementos nativos o incorporados normalmente en las estructuras de sulfuros, silicatos, carbonatos, óxidos e hidróxidos (ROSALES, L., 2008).

CAPITULO II

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Lugar de la investigación

La presente investigación se desarrolló en el laboratorio de Biotecnología del Centro de Servicios Técnicos y Transferencia Tecnológica Ambiental CESTTA de la Facultad de Ciencias ubicado a 2756 m.s.n.m. con una temperatura promedio de 13 °C - 25 °C, humedad relativa promedio de 30 – 60% y una presión atmosférica de 540 mm Hg.

Los análisis físicos, químicos y microbiológicos de las aguas y sedimentos se realizaron en el laboratorio de Análisis Ambiental e Inspección LAB-CESTTA con acreditación en la ISO/IEC 17025:2005.

2.2. Materiales utilizados

2.2.1. *Agua contaminada*

El agua contaminada procedió de la planta de tratamiento del LAB-CESTTA adonde se eliminan los remanentes de las muestras que ya han sido analizadas, fue muestreada para la determinación de sus características físicas, químicas y microbiológicas y la obtención de material biológico para la elaboración de los consorcios bacterianos.

2.2.2. *Sedimento Contaminado*

El sedimento contaminado procedió del residual de muestras de sedimentos ingresados al LAB-CESTTA así como del generado en la planta de tratamiento del LAB-CESTTA producto de la floculación y sedimentación de materia orgánica, sólidos sedimentables, suspendidos y totales el cual fue muestreado para la determinación de sus características

físicas, químicas y microbiológicas y la obtención de material biológico para la elaboración de los consorcios bacterianos.

2.2.3. *Sustratos*

Sustancia en la cual crecen tanto las cepas como los consorcios bacterianos aislados a partir de las aguas y sedimentos de la planta de tratamiento del LAB-CESTTA.

Los sustratos utilizados fueron:

- Medio nutritivo no selectivo
- Medios mínimos específicos

2.3. Toma de muestra

2.3.1. *Aguas*

La metodología de toma de muestras de agua se realizó siguiendo el procedimiento PEE/LAB-CESTTA/01 Toma y conservación de muestras de agua basado en el Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater APHA 1060.

2.3.2. *Sedimentos*

La metodología para la toma de muestras de sedimentos se realizó siguiendo el PEE/LAB-CESTTA/03 Toma y conservación de muestras de suelos/sedimentos basado en Environmental Protection Agency (EPA) Preparation of Soil Sampling Protocols: Sampling Techniques and Strategies. EPA/600/R-92/128.

2.4. Metodología

La metodología aplicada para el **AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y ELABORACIÓN DE UN CONSORCIO BACTERIANO PARA BIORREMEDIACIÓN DE AGUAS Y SEDIMENTOS CONTAMINADOS**

PROVENIENTES DEL RESIDUAL DE LAS MUESTRAS INGRESADAS AL LAB-CESTTA correspondió a lo siguiente.

Se obtuvo el material biológico para la obtención de las cepas bacterianas nativas de las aguas y sedimentos de la planta de tratamiento del LAB-CESTTA y del residual de sedimentos ingresados al laboratorio, luego estas muestras fueron procesadas mediante técnicas de siembra convencionales en un medio nutritivo no específico, cada una de las colonias fueron aisladas y purificadas mediante siembras sucesivas. Las cepas puras se caracterizaron macroscópica y microscópicamente, se elaboraron bancos primarios y secundarios con el fin de obtener material biológico suficiente para el desarrollo de las pruebas de selección.

Las pruebas de selección a las que fueron sometidas las cepas fueron antagonismo, emulsificación, degradación de hidrocarburos. Una vez finalizadas las primeras pruebas de selección de cepas idóneas, se procedió a la elaboración de los consorcios bacterianos para someterlos a una última prueba que consistía en la reducción de metales misma que duró un periodo de un mes. Una vez terminada esta prueba se muestrean los sedimentos que se generan en la planta de tratamiento del LAB-CESTTA y los residuales de muestras ingresadas al laboratorio, después de homogenizar los sedimentos se procedió a disponer estos en recipientes rectangulares plásticos uno por cada consorcio bacteriano y un blanco.

Se realizó la caracterización fisico-química y microbiológica de los sedimentos generados en el LAB-CESTTA, se inocularon con los respectivos consorcios y se realizó un seguimiento para mantener estables los parámetros de control; las unidades experimentales se analizaron a los quince, treinta días y sesenta días con el fin de verificar los cambios producidos durante el proceso de biorremediación y darles la disposición final respectiva.

2.5. Diseño experimental

Para el desarrollo de la siguiente investigación se realizaron tres pruebas para la selección de las cepas idóneas para el proceso de biorremediación de sedimentos provenientes de la planta de tratamiento del LAB-CESTTA y de los residuales de

muestras ingresadas al laboratorio. Finalmente se realizó una prueba adicional en los consorcios para establecer la capacidad de reducción de los contaminantes metálicos.

Debido a que todos los parámetros analizados en las muestras de agua se encontraron dentro de los límites permisibles establecidos en la normativa ambiental aplicable. (Tabla 11 del Libro VI Anexo 1 del TULAS) no se trabajó en esta matriz sino únicamente en los sedimentos.

La investigación consistió en la conformación y evaluación de los consorcios bacterianos nativos provenientes de las aguas y sedimentos del LAB-CESTTA para su uso en biorremediación de sedimentos contaminados a escala de laboratorio. Se trabajó con 3 tratamientos, con tres unidades experimentales y un blanco, a las que se controló el pH, humedad y temperatura tres veces por semana durante 60 días, la aireación se suministró mediante volteo. El análisis físico químico y microbiológicos se realizó en periodos de 20 días en las unidades experimentales.

2.5.1. Tipo de diseño

Para este experimento se vio la necesidad de trabajar con dos tipos de diseño los cuales serán descritos a continuación.

Diseño experimental temporal: (de cronologías múltiples, observaciones luego del tratamiento), se lo utiliza cuando se quiere medir los efectos de un determinado tratamiento a largo plazo.

R G₁O₁– O₂ O₃

R G₂O₁ X O₂ O₃

R G₃O₁ X O₂ O₃

R G₄O₁ X O₂ O₃

R= Sedimento contaminado de la planta de tratamiento del LAB-CESTTA.

G₁= Sedimento contaminado sin aplicación de consorcios bacterianos nativos (blanco).

G₂= Consorcio bacteriano nativo A

G₃= Consorcio bacteriano nativo B

G₄= Consorcio bacteriano nativo A+B

X = Tratamiento; aplicación de los consorcios bacterianos nativos en el sedimento contaminado

(-) = Sin inóculos bacterianos nativos

O₁=Análisis físico químico y microbiológico del sedimento contaminado antes de la inoculación de los consorcios bacterianos nativos.

O₂, O₃= Análisis físico químico y microbiológico del sedimento contaminado después de la inoculación de los consorcios bacterianos nativos.

2.5.2. Tratamientos

El sedimento contaminado proveniente de la planta de tratamiento del LAB-CESTTA tiene un peso de 10 Kg.

Se lo repartió equitativamente en las 4 cubetas plásticas, los tratamientos son

T1=Sedimento contaminado inoculado con consorcio bacteriano nativo A

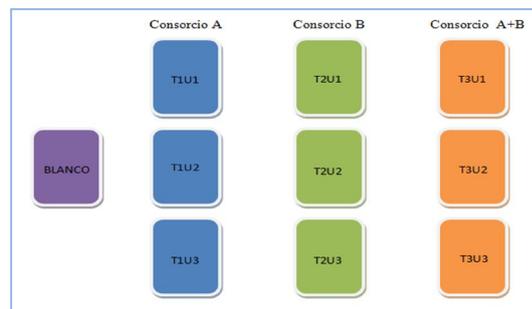
T2=Sedimento contaminado inoculado con consorcio bacteriano nativo B

T3=Sedimento contaminado inoculado con consorcio bacteriano nativo A+B

Las unidades experimentales se mantuvieron a temperatura ambiente, para ayudar al proceso de biorremediación se dio aireación manual mediante volteo.

La finalidad inocular el sedimento contaminado con dos consorcios bacterianos nativos diferentes y con la combinación de estos es seleccionar el mejor inóculo bacteriano nativo para la biorremediación de los sedimentos contaminados generados en el LAB-CESTTA.

Figura 1-2: DISPOSICIÓN DE TRATAMIENTOS Y UNIDADES EXPERIMENTALES



Realizado por: MIRANDA, J. 2014

2.5.3. Parámetros de control

Es imprescindible que se tome en cuenta parámetros de control durante el proceso de biorremediación (60 días).

- pH
- Humedad
- Temperatura
- Concentración bacteriana

2.5.4. Parámetros de medición

Los parámetros a analizar en las aguas de la planta de tratamiento del LAB-CESTTA son los establecidos en la Tabla 11. Límites de descarga al sistema de alcantarillado público del Libro VI Anexo 1 del TULAS.

Para este estudio se analizaron en los sedimentos; metales pesados e hidrocarburos totales de petróleo en base a su toxicidad para el medio ambiente y la vida.

2.6. Métodos

Tabla 1-2: MÉTODOS DE ANÁLISIS AGUAS

PARÁMETRO	MÉTODO	REFERENCIA
Aceites y grasas	PEE/LABCESTTA/42	Standard Methods No. 5520 B
Aluminio	PEE/LABCESTTA/174	EPA 200.7 / EPA 3015a ICP
Arsénico	PEE/LABCESTTA/174	EPA 200.7 / EPA 3015a ICP
DBO₅	PEE/LABCESTTA/46	Standard Methods No. 5210 B
DQO	PEE/LABCESTTA/09	Standard Methods No. 5220 D
Hierro	PEE/LABCESTTA/174	EPA 200.7 / EPA 3015a ICP
Mercurio	PEE/LABCESTTA/174	EPA 200.7 / EPA 3015a ICP
Níquel	PEE/LABCESTTA/174	EPA 200.7 / EPA 3015a ICP
pH	PEE/LABCESTTA/05	Standard Method No. 4500-H+ B
Sólidos sedimentables	PEE/LABCESTTA/56	Standard Methods No. 2540 F
Sólidos suspendidos	PEE/LABCESTTA/13	Standard Methods No. 2540 D
Sólidos Disueltos Totales	PEE/LABCESTTA/11	Standard Methods No. 2540 C
Tensoactivos	PEE/LABCESTTA/44	Standard Methods No. 5540 C

Fuente: LAB-CESTTA

Tabla 2-2: MÉTODOS DE ANÁLISIS SEDIMENTOS

PARÁMETRO	MÉTODO	REFERENCIA
pH	PEE/LABCESTTA/24	EPA 9045 D
Bario	PEE/LABCESTTA/197	EPA 3051 a / EPA 200.7 ICP
Aluminio	PEE/LABCESTTA/197	EPA 3051 a / EPA 200.7 ICP
Arsénico	PEE/LABCESTTA/197	EPA 3051 a / EPA 200.7 ICP
Cadmio	PEE/LABCESTTA/197	EPA 3051 a / EPA 200.7 ICP
Cromo	PEE/LABCESTTA/197	EPA 3051 a / EPA 200.7 ICP
Mercurio	PEE/LABCESTTA/197	EPA 3051 a / EPA 200.7 ICP
Níquel	PEE/LABCESTTA/197	EPA 3051 a / EPA 200.7 ICP
Plomo	PEE/LABCESTTA/197	EPA 3051 a / EPA 200.7 ICP
Selenio	PEE/LABCESTTA/197	EPA 3051 a / EPA 200.7 ICP
Cobre	PEE/LABCESTTA/197	EPA 3051 a / EPA 200.7 ICP
TPH	PEE/LABCESTTA/26	TNRCC 1005
Humedad	PEE/LABCESTTA/80	ASTM D4959
Aerobios	PEE/LABCESTTA/145	Standard Methods APHA 9215 B
Temperatura	-	Termometría

Fuente: LAB-CESTTA

CAPITULO III

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Procesamiento de muestras biológicas

Las bacterias presentes en las muestras de agua y sedimentos tanto de la planta de tratamiento del LAB-CESTTA así como del residual de muestras ingresadas necesitan nutrientes básicos como son los aportados por los medios de cultivo no selectivos como es el agar nutritivo.

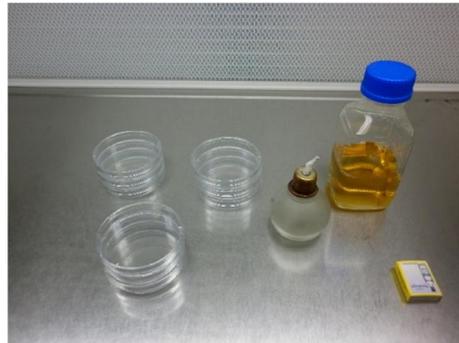
3.1.1. *Materiales equipos y reactivos*

- Cámara de flujo laminar
- Autoclave
- Incubadora
- Balanza analítica
- Frascos de y tubos de vidrio con tapa rosca
- Cajas petri de vidrio o plástico
- Gradilla
- Cinta Petrifilm
- Frascos plásticos
- Asa bacteriológica
- Lámpara de alcohol
- Pipeta automática
- Peptona
- Agar nutritivo

3.1.2. Procedimiento

- a. Preparar la suficiente cantidad de peptona bacteriológica, dosificarla en frascos y tubos de acuerdo al número de diluciones a necesitarse y esterilizar en el autoclave.
- b. Preparar agar nutritivo, esterilizar en el autoclave, dispensar en cajas petri y dejar solidificar.
- c. Pesar la muestra de sedimento homogenizada y colocar en el frasco de agua de peptona estéril correspondiente a la primera dilución y agitar.
- d. Tomar una alícuota de la primera dilución y transferir al envase correspondiente a la segunda dilución. Realizar este proceso hasta completar el número de diluciones requeridas.
- e. Colocar una alícuota de las diluciones en cada una de las cajas petri y esparcir con ayuda de la aza bacteriológica sobre la superficie del agar.
- f. Incubar.

Ilustración 1-3: PREPARACIÓN DE CAJAS CON AGAR



Realizado por: MIRANDA, J. 2014

3.2. Aislamiento y purificación de las cepas bacterianas

Para la realización de las pruebas de selección de las cepas bacterianas idóneas para el proceso de biorremediación es necesario contar con las cepas bacterianas puras que se obtienen mediante un proceso de aislamiento consecutivo.

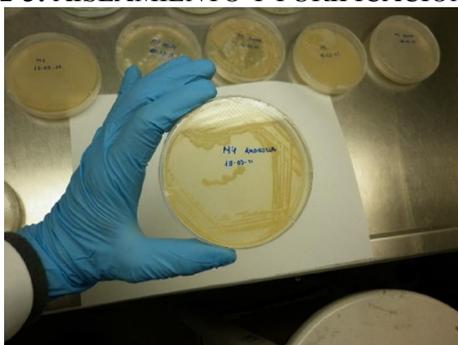
3.2.1. *Materiales equipos y reactivos*

- Cámara de flujo laminar
- Autoclave
- Incubadora
- Balanza analítica
- Microscópio
- Frascos de vidrio con tapa de 250 mL
- Tubos tapa rosca de 20 ml
- Cajas petri de vidrio o plástico
- Gradilla
- Cinta petrifilm
- Frascos plásticos
- Asa bacteriológica
- Lámpara de alcohol
- Pipeta automática
- Agar nutritivo

3.2.2. *Procedimiento*

- a. Pesamos el agar nutritivo, disolvemos en agua destilada, esterilizamos en el autoclave, dispensamos en cajas petri hasta que se solidifiquen.
- b. Con ayuda de la aza bacteriológica inoculamos las nuevas cajas con agar e incubamos. Repetimos el proceso hasta observar uniformidad total en todas las colonias aisladas.
- c. Verificamos la pureza de las cepas mediante la observación microscópica.

Ilustración 2-3: AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE CEPAS



Realizado por: MIRANDA, J. 2014

3.3. Caracterización macroscópica y microscópica de las cepas bacterianas

La caracterización macroscópica y microscópica permite evaluar que no existan mutaciones de las cepas que vayan a ser seleccionadas para conformar el consorcio en un tiempo determinado. Se realiza una inspección de las cepas mensualmente para verificar que conserven sus características iniciales, mediante su reactivación en caldo nutritivo y su siembra en un medio sólido.

3.3.1. *Materiales Equipos Y Reactivos*

- Cámara de flujo laminar
- Microscopio
- Porta objetos
- Azul violeta
- Lugol
- Alcohol acetona
- Zafranina
- Aceite de inmersión
- Asa bacteriológica
- Lámpara de alcohol

3.3.2. Procedimiento

- a. Observamos en la caja petri las características macroscópicas de las colonias y registramos los datos.
- b. Tomamos con aza bacteriológica esterilizada a la llama una muestra de las colonias de cada una de las cajas petri
- c. Hacemos el extendido en espiral sobre el porta objetos
- d. Dejamos secar a temperatura ambiente o fijarlas utilizando un mechero.
- e. Agregamos los reactivos de tinción sobre la placa.
- f. Finalmente colocamos aceite de inmersión el cubre objetos y observamos al microscopio con el lente de 100 X.
- g. Registramos las características microscópicas observadas.

Ilustración 3-3: ADICIÓN DE REACTIVO EN EL PROCESO DE TINCIÓN



Realizado por: MIRANDA, J. 2014

Ilustración 4-3: OBSERVACIÓN DE PLACAS AL MICROSCOPIO



Realizado por: MIRANDA, J. 2014

3.4. Elaboración de bancos bacterianos primarios y secundarios

Este procedimiento se lo realiza a fin de obtener réplicas de cepas para poder realizar cada una de las pruebas de selección y tener en stock cada una de las cepas aisladas.

3.4.1. *Materiales, equipos y reactivos*

- Puntas
- Mechero de alcohol
- Micro pipeta
- Tubos de ensayo
- Tubos eppendorf
- Caldo nutritivo
- Incubadora

3.4.2. *Procedimiento*

- a. Preparamos caldo nutritivo y caldo nutritivo + glicerol dosificamos en tubos y esterilizamos.
- b. Inoculamos las cepas puras con el asa en los tubos de ensayo que se encuentra solo caldo nutritivo e incubamos.
- c. Mezclamos los tubos de ensayo inoculados e incubados con los tubos de caldo nutritivo con glicerol.
- d. Dosificamos el medio en tubos eppendorf y rotulamos el lote para identificarlos. **(Banco Primario)** y mantenerlos en congelación para utilizarlos posteriormente.
- e. Los bancos secundarios se realizan a partir de las cepas del banco primario.
- f. Trabajamos como en a hasta d, pero esta vez preparamos el medio en un volumen mayor.

Ilustración 5-3: ELABORACIÓN DE BANCOS SECUNDARIOS DE CEPAS



Realizado por: MIRANDA, J. 2014

3.5. Prueba de emulsificación

La prueba de emulsificación sirve para evaluar la capacidad que tienen las bacterias de producir emulsificantes de petróleo.

3.5.1. Materiales, equipos y reactivos

- Frascos plásticos autoclavables
- Matraces de 100 ml
- Lámpara de alcohol
- Marcadores permanentes
- Puntas azules estériles de 1 ml
- Tubos de ensayo de plástico con tapa rosca.
- Pipeta automática (100 – 1000 ul)
- Cámara de flujo laminar
- Autoclave
- Incubadora
- Agitador de placas
- Reverbero
- Centrífuga
- Espectrofotómetro
- Vortex

- Caldo nutritivo
- Sales de potasio
- Sales de Magnesio
- Sales de amonio
- Etanol
- Extracto de levaduras
- Petróleo

3.5.2. Procedimiento

- Reactivamos las cepas bacterianas.
- Preparamos el medio mínimo y dosificamos uniformemente en matraces.
- Colocamos las cepas reactivadas en matraces que contenga un medio de cultivo mínimo. Incubamos los matraces y agitamos periódicamente.
- trasvasamos el medio mínimo a tubos de plástico con tapa rosca y centrifugamos. Colocamos el sobrenadante en otro tubo y agregamos unas gotas de petróleo crudo y agitamos con ayuda de un vortex.
- Leemos la absorbancia de longitud de onda con ayuda del espectrofotómetro, el blanco es un tubo que contiene el medio de cultivo sin inoculación. La absorbancia leída la convertimos en unidades de actividad emulsificante por mililitro (UAE/ml)

Ilustración 6-3: PREPARACIÓN DE TUBOS PARA PRUEBA DE ACTIVIDAD EMULSIFICANTE



Realizado por: MIRANDA, J. 2014

3.6. Prueba de degradación de hidrocarburos

3.6.1. Materiales equipos y reactivos

- Matraces de 100 ml
- Frascos plásticos autoclavables.
- Lámpara de alcohol.
- Puntas azules estériles
- Cámara de flujo laminar
- Agitador de placas
- Reverbero
- Autoclave
- Incubadora
- Pipeta de 1 ml
- Sal de potasio
- Sales de sodio
- Sales de magnesio
- Fosfato
- Sal de amonio
- Petróleo
- Caldo nutritivo
- Escala de Mc. Farland

3.6.2. Procedimiento

- a. Reactivamos las cepas bacterianas en tubos.
- b. Preparamos el medio mineral y repartimos en los matraces esterilizamos y enfriamos.
- c. Adicionamos el crudo que será la única fuente de carbono por cada matraz.
- d. Añadimos las cepas reactivadas a cada matraz.

- e. Incubamos los matraces y los mantenemos en agitación y temperatura constante, utilizando el agitador de placas y el reverbero.
- f. El crecimiento se verifica por la turbidez formada en el medio de cultivo que contienen los matraces.
- g. Se considera como blanco negativo un matraz que contiene el medio mineral sin inoculación. Las lecturas se las realiza comparando la turbidez formada en el medio que contienen los matraces frente a la escala de Mc. Farland.

Ilustración 7-3: COLOCACIÓN DE CRUDO PARA LA PRUEBA DE PODER DEGRADATIVO



Realizado por: MIRANDA, J. 2014

3.7.Prueba de antagonismo

La prueba de antagonismo bacteriano consiste en el enfrentamiento de diferentes cepas de bacterias con el fin de verificar cuál de ellas es antagónica al resto de cepas.

El antagonismo se produce por la producción de sustancias (metabolitos) con características antibióticas las cuales inhiben el crecimiento de las cepas bacterianas que se siembran conjuntamente en la caja petri.

3.7.1. Materiales, equipos y reactivos

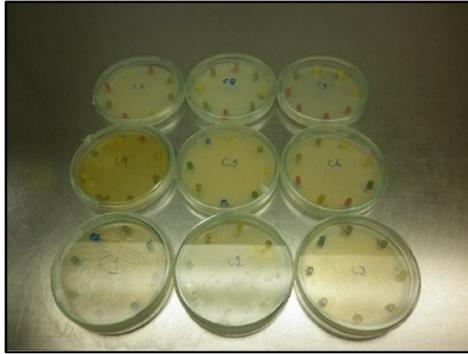
- Frascos autoclavables.
- Lámpara de alcohol.
- Marcadores permanentes
- Puntas amarillas estériles
- Cajas petri.

- Hisopos.
- Tubos tapa rosca de 20 ml.
- Sorbetes.
- Pinza.
- Cinta parafilm.
- Caldo Nutritivo
- Agar Nutritivo

3.7.2. *Procedimiento*

- a. Reactivamos las cepas bacterianas.
- b. Preparamos agar nutritivo, esterilizamos y dosificamos en cajas petri dejar enfriar.
- c. Tomamos el tubo con la primera cepa bacteriana y sembramos masivamente sobre el agar nutritivo de la primera caja petri. Repetimos el proceso del punto anterior para cada una de las cepas bacterianas. Identificamos cada caja petri con el número de la cepa bacteriana sembrada.
- d. Con una pinza esterilizada a la llama tomamos trozos de sorbete y los colocamos sobre el medio de cultivo, en forma circular. En el reverso de la caja petri colocamos el número de cada cepa bacteriana que va a enfrentar, a la misma altura de los sorbetes.
- e. Con ayuda de una micro pipeta y puntas amarillas estériles, dosificamos en el interior de los sorbetes cada cepa bacteriana. Sellamos las cajas con cinta e incubamos.
- f. Verificamos la formación de halos de inhibición alrededor de cada sorbete. Si observa el halo de inhibición, significa que esa cepa es antagónica y se descarta para el proceso de masificación.

Ilustración 7-3: PREPARACIÓN DE CAJAS PARA PRUEBA DE ANTAGONISMO



Realizado por: MIRANDA, J. 2014

3.8. Prueba de reducción de metales

3.8.1. Materiales equipos y reactivos

- Pipetas
- Frascos autoclavables.
- Lámpara de alcohol.
- Marcadores permanentes
- Puntas azules estériles
- Cámara de flujo laminar
- Agitador de placas
- Reverbero
- Autoclave
- Incubadora
- Pipeta de 1 ml
- Sal de potasio
- Sales de sodio
- Sales de magnesio
- Fosfatos
- Sal de amonio
- Estándares de Metales.

- Caldo nutritivo

3.8.2. *Procedimiento*

- a. Reactivamos las cepas bacterianas en tubos con caldo nutritivo y formamos los consorcios.
- b. Preparamos un mix de metales a una concentración aproximada de 4 ppm de cada metal a analizar. (Al, As, Ba, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb, Se).
- c. Preparamos el medio mineral adicionando los reactivos al mix de metales, repartir en los frascos un volumen mayor a 200 ml del medio mineral.
- d. Esterilizamos los frascos con el medio mineral y dejamos enfriar.
- e. Luego añada el caldo nutritivo con cada uno de los consorcios bacterianos.
- f. Incubamos los matraces, agitamos periódicamente, utilizando el agitador de placas y el reverbero como fuente de calor.
- g. El crecimiento se verifica por la turbidez formada en el medio de cultivo que contienen los matraces.
- h. Para determinar la reducción de metales durante el periodo de incubación y al final del mismo se realizará lo siguiente.
 - i. Pesamos un filtro de membrana.
 - j. Filtramos una parte del medio de cultivo a través del filtro de membrana.
 - k. Pesar nuevamente el filtro para y anotar la cantidad de biomasa obtenida.
 - l. Analizar los metales presentes en la biomasa por ICP o afín.

3.9. Muestreo en el laboratorio

Para realizar los análisis en el laboratorio proceder a realizar un muestreo de cada unidad experimental, homogenizar la muestra y realizar un cuarteo tomándose el sedimento de las esquinas y volver a repetir el procedimiento tomando así una muestra representativa.

Para el diagnóstico y caracterización del suelo tratar una muestra inicial lo más homogénea posible de cada unidad experimental antes de aplicar los inóculos

bacterianos, el sedimento es caracterizarlo de acuerdo a parámetros establecidos para esta investigación.

3.10. Métodos analíticos

3.10.1. Determinación de metales (Al, As, Ba, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Se)

Una fuente de ICP consiste en una corriente de flujo de gas argón ionizado por aplicación de un campo de radiofrecuencias típicamente oscilantes a 27,1 MHz este campo esta acoplado inductivamente al gas ionizado por una bobina refrigerada con agua que rodea a la antorcha de cuarzo que soporta y confían el plasma. Con un nebulizador y una cámara de pulverización se genera un aerosol que se lleva al plasma a través de un tubo inyector directamente y que someten a temperaturas elevadas.

Procedimiento para análisis de biomasa en mix de metales

- a. Pesar el filtro.
- b. Filtrar 100 mL de la solución.
- c. Secar el filtro hasta peso constante.
- d. Ver la diferencia de peso.
- e. Colocar el filtro en el tubo de digestión.
- f. Agregar de Ácido Nítrico p.a 1:1.
- g. Someter a digestión acelerada por microondas.
- h. Esperar que se enfríe.
- i. Filtrar y aforar en un balón.
- j. Medir en el equipo ICP
- k. Realizar los cálculos respectivos.

Procedimiento para análisis de sedimento

- l. Secar el sedimento en estufa.

- m. Triturar tamizar y pesar aproximadamente 0,5 g
- n. Colocar el sedimento seco en el tubo de digestión.
- o. Agregar de Ácido Nítrico p.a 1:1.
- p. Someter a digestión acelerada por microondas.
- q. Esperar que se enfríe.
- r. Filtrar y aforar en un balón de 50mL.
- s. Medir en el equipo ICP
- t. Realizar los cálculos respectivos.

3.10.2. Determinación de hidrocarburos totales de petróleo

1. Principio

Hidrocarburos Totales de Petróleo (TPH), por cromatografía de gases.

Este método se basa en la extracción con n-hexano, seguido por cromatografía de gases y detección por ionización de flama. La concentración de TPH's es reportado como la sumatoria de todo rango de carbono; ejemplo nC7 o nC35.

2. Referencia

PEE/LABCESTTA /26 Método de referencia TNRCC 1005, Junio 2001.

3.10.3. Determinación de Ph

1. Principio

La medición de pH de un suelo, usando potenciómetro y electrodos de vidrio se basa en la medición del potencial eléctrico que se crea en la membrana de vidrio del mismo, lo cual es función de las actividades de iones hidrógeno a ambos lados de la membrana.

En este procedimiento, donde la medición del pH se hace en suspensión el contenido de humedad no guarda una relación definida con las condiciones de campo y lo que en

realidad se determina es el pH de la solución, cuya concentración de iones hidrógeno entra en equilibrio con los iones de hidrógeno en el suelo.

2. Referencia

PEE/LABCESTTA/24 Método de referencia: EPA 9045 D. 2004

3.10.4. Determinación de la humedad

Determinación gravimétrica por diferencia de pesos pesando la muestra antes de ser secada, y luego de seca.

3.10.5. Determinación de temperatura

Los átomos y moléculas en una sustancia no siempre se mueven a la misma velocidad. Esto significa que hay un rango de energía (energía de movimiento) en las moléculas. La temperatura es una medida del calor o energía térmica de las partículas en una sustancia.

Como lo que medimos en su movimiento medio, la temperatura no depende del número de partículas en un objeto y por lo tanto no depende de su tamaño.

3.10.6. Determinación de concentración bacteriana

La determinación de la concentración bacteriana se la realiza mediante la preparación de una serie de diluciones sucesivas en un medio nutritivo básico y posterior siembra en placa y conteo.

CAPITULO IV

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Elaboración de los consorcios bacterianos

De un total de 20 cepas aisladas en el laboratorio y una vez concluidas las pruebas de selección se obtuvieron 9 cepas que formarían los tres consorcios. Se usaron los mismos sustratos en los tres consorcios el primer consorcio contenía una mezcla de cinco cepas el segundo de cuatro y el tercero es la combinación de las nueve cepas.

Tabla 1-4: CARACTERIZACIÓN MACRO Y MICROSCÓPICA DE CEPAS

N°	Código Colonia	Forma	Color	Tamaño	Bordes	Superf.	Gram	F. Cel.	Esp.
1	SC ₁	Regular	Tomate	Grande	Regulares	Plana	-	Bacilo	No
2	SC ₂	Regular	Crema	Mediana	Regulares	Plana	-	Cocos	No
3	SC ₃	Regular	Rojizo	Mediana	Regulares	Convexa	-	Cocos	No
4	SC ₄	Regular	Amarilla	Mediana	Regulares	Plana	-	Bacilos	No
5	SC ₅	Irregular	Amarilla	Mediana	Irregulares	Convexa	-	Bacilos	No
6	SC ₆	Irregular	Crema	Mediana	Regulares	Plana	-	Bacilos	No
7	SC ₇	Regular	Crema	Grande	Regulares	Plana	-	Bacilos	No
8	SC ₈	Irregular	Crema	Mediana	Irregulares	Plana	-	Bacilos	No
9	SC ₉	Regular	Rosada	Mediana	Regulares	Plana	+	Bacilos	No
10	SC ₁₀	Regular	Rosada	Grande	Regulares	Convexa	-	Bacilos	No
11	SC ₁₁	Irregular	Crema	Grande	Irregulares	Convexa	-	Bacilos	No
12	SC ₁₂	Irregular	Crema	Grande	Irregulares	Convexa	-	Bacilos	No
13	SC ₁₃	Irregular	Blanca	Grande	Regulares	Plana	-	Bacilos	No
14	SC ₁₄	Irregular	Blanca	Mediana	Irregulares	Plana	-	Bacilos	No
15	SC ₁₅	Regular	Crema	Mediana	Regulares	Plana	+	Bacilos	No
16	SC ₁₆	Irregular	Crema	Mediana	Irregulares	Plana	-	Bacilos	No
17	AC ₁₇	Irregular	Crema	Mediana	Irregulares	Convexa	+	Bacilos	No
18	AC ₁₈	Regular	Crema	Mediana	Regulares	Plana	-	Bacilos	No
19	AC ₁₉	Irregular	Blanca	Grande	Regulares	Convexa	-	Bacilos	No
20	AC ₂₀	Irregular	Crema	Grande	Regulares	Plana	-	Bacilos	No

Realizado por: MIRANDA, J. 2014

Las colonias aisladas presentaron forma y bordes regulares e irregulares, en cuanto al color obtuvimos colonias de color en su mayoría blancas y cremas además de algunas de color rosado, amarillo rojizo y tomate. Las superficies predominantes fueron las planas que eran de tamaño variante.

Al realizar la observación al microscopio se determinó que las cepas aisladas en su mayoría eran bacilos GRAM – y ninguna presentó esporulación tal como se muestra en la tabla 1-4. Se encontraron 20 cepas bacterianas puras a las cuales se etiquetó de acuerdo a la procedencia agua o sedimento. Se elaboraron bancos primarios y secundarios de estas cepas para luego someterlos a las pruebas detalladas a continuación.

4.2. Prueba de emulsificación

Las cepas SC₁, SC₂, SC₃, SC₄, SC₇, SC₈, SC₉, SC₁₀, SC₁₃, SC₁₄, SC₁₆, AC₁₇, AC₁₈, AC₁₉ tuvieron unidades de poder emulsificante que van desde 3,2 a 3,8 UAE/mL tal como se ve en la tabla 2-4 por tanto estas cepas tienen la capacidad de producir emulsificantes de petróleo y se conservan para continuar con la prueba de degradación de hidrocarburos. Las demás cepas al poseer unidades de actividad emulsificante menores a 3 se descartaron.

Tabla 1-4: UNIDADES DE ACTIVIDAD EMULSIFICANTE DE LAS CEPAS

Código cepa	Absorbancia	Factor de conversión	UAE/ml
SC ₁	4,423	0,816	3,609
SC ₂	4,012	0,816	3,274
SC ₃	4,125	0,816	3,366
SC ₄	4,252	0,816	3,470
SC ₅	2,002	0,816	1,634
SC ₆	2,032	0,816	1,658
SC ₇	4,735	0,816	3,864
SC ₈	4,011	0,816	3,273
SC ₉	4,008	0,816	3,271
SC ₁₀	4,442	0,816	3,625
SC ₁₁	1,052	0,816	0,858
SC ₁₂	2,033	0,816	1,659
SC ₁₃	4,842	0,816	3,951
SC ₁₄	4,203	0,816	3,430
SC ₁₅	2,982	0,816	2,433
SC ₁₆	4,155	0,816	3,390
AC ₁₇	4,042	0,816	3,298
AC ₁₈	4,462	0,816	3,641
AC ₁₉	4,005	0,816	3,268
AC ₂₀	1,126	0,816	0,919

Realizado por: MIRANDA, J. 2014

4.3. Prueba de degradación de hidrocarburos

Se presentan los resultados de la capacidad de degradación de hidrocarburos las cepas SC₁₀ y AC₁₉ presentaron una turbidez según la escala Mc. Farland de +3, dándonos una población aproximada de 9x10⁸ UFC/mL lo que nos indica un crecimiento bueno de nuestras cepas. Las cepas SC₁, SC₃, SC₇ y AC₁₇ presentaron una turbidez según la escala Mc. Farland de +4, dándonos una población aproximada de 12x10⁸ UFC/mL lo que nos indica un crecimiento muy bueno de nuestras cepas.

Las cepas SC₄, SC₈, SC₁₃, SC₁₄, SC₁₆ y AC₁₈ alcanzaron una turbidez según la escala Mc. Farland de +5, dándonos una población aproximada de 15x10⁸ UFC/mL lo que nos indica un crecimiento muy bueno de nuestras cepas. Las cepas con turbidez desde +3 poseen actividad degradativa frente al crudo. Las cepas SC₂, SC₉ se descartan por tener una turbidez baja. Estos datos se ven reflejados en la tabla 3-4.

Tabla 2-4: POBLACIÓN APROXIMADA DE MICROORGANISMOS DE ACUERDO A LA TURBIDEZ MEDIDA EN LA ESCALA MC. FARLAND

Código cepa	Turbidez	Población aproximada
SC ₁	+4	12x10 ⁸ UFC/mL
SC ₂	+2	6x10 ⁸ UFC/mL
SC ₃	+4	12x10 ⁸ UFC/mL
SC ₄	+5	15x10 ⁸ UFC/mL
SC ₇	+4	12x10 ⁸ UFC/mL
SC ₈	+5	15x10 ⁸ UFC/mL
SC ₉	+2	6x10 ⁸ UFC/mL
SC ₁₀	+3	9x10 ⁸ UFC/mL
SC ₁₃	+5	15x10 ⁸ UFC/mL
SC ₁₄	+5	15x10 ⁸ UFC/mL
SC ₁₆	+5	15x10 ⁸ UFC/mL
AC ₁₇	+4	12x10 ⁸ UFC/mL
AC ₁₈	+5	15x10 ⁸ UFC/mL
AC ₁₉	+3	9x10 ⁸ UFC/mL

Realizado por: MIRANDA, J. 2014

4.4. Prueba de antagonismo

En la Tabla VI se observan las cepas antagonicas. La cepa SC₃, es antagonica a la cepa de fondo SC₁₃, la cepa AC₁₇ y AC₁₉, es antagonica a la cepa SC₄ ya que hubo formación de halos de inhibición en las cajas petri con agar por otro lado las cepas SC₁, SC₄, SC₇,

SC₈, SC₁₀, SC₁₃, SC₁₄, SC₁₆ y AC₁₈ no presentaron ningún halo con respecto a la cepa de fondo tal como se aprecia en la tabla 4-4.

Tabla 3-4: RESULTADOS DE LA PRUEBA DE ANTAGONISMO

Código cepa	Antagónica	Código cepa
SC ₁	NO	-
SC ₃	SI	SC ₁₃
SC ₄	NO	-
SC ₇	NO	-
SC ₈	NO	-
SC ₁₀	NO	-
SC ₁₃	NO	-
SC ₁₄	NO	-
SC ₁₆	NO	-
AC ₁₇	SI	SC ₄
AC ₁₈	NO	-
AC ₁₉	SI	SC ₄

Realizado por: MIRANDA, J. 2014

Una vez seleccionadas las cepas idóneas se procede a realizar la prueba de identificación.

4.5. Prueba de identificación

La prueba de identificación se realizó por medio de las pruebas bioquímicas las cuales son fáciles de manipular ahorran tiempo y proporcionan buenos resultados, estos kits en forma de bandas nos ayudan a someter a las cepas a diferentes sustancias y por medio del color que toman se les asigna un valor el mismo que al colocarlo en el software nos permitió conocer el nombre de cada una de las cepas.

En la tabla 5-4 se describe el código de la cepa el nombre y la eficiencia que hace referencia al porcentaje de existencia de la especie bacteriana en nuestro caso tuvimos eficiencias superiores al 80% lo que nos indica buena pureza de los bancos bacterianos.

Tabla 4-4: IDENTIFICACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS

Cepa	Código	Eficiencia %	Nombre de Especie Bacteriana
SC ₁	06200040	88,4	<i>Shigella serogroups A,B y C</i>
SC ₄	00250000	96,34	<i>Povidencia rustigianii</i>
SC ₇	70310001	92,61	<i>Morganella morgarii biogp 1</i>
SC ₈	00654000	98,49	<i>Xenorhabdus nematophilis</i>
SC ₁₀	06255776	100	<i>Enterobacter agglomerans complex</i>
SC ₁₃	00640001	99,08	<i>Shigella serogroups C</i>
SC ₁₄	00204000	99,85	<i>Xenorhabdus nematophilis</i>
SC ₁₆	00200000	93,5	<i>Xenorhabdus nematophilis</i>
AC ₁₈	10654001	99,94	<i>Proteus vulgaris</i>

Realizado por: MIRANDA, J. 2014

SERRANO, P. en la investigación llamada “Obtención del Consorcio Bacteriano Nativo del Sedimento de la Laguna de Colta del Cantón Colta” en la prueba de identificación obtiene bacterias como *Escherichia coli-inactive*, *Xenorhabdus nematophilis*, *Providencia stuartii*, *Shigella Serogroups A,B y C*, *Xanthomonas maltophilia*, *Morganella morgarii biogp*, en comparación algunas de estas bacterias también se encontraron en los sedimentos del LAB-CESTTA (SERRANO, P., 2014).

4.6. Prueba de reducción de metales en cada uno de los inóculos conformados

Los consorcios bacterianos mixtos que se usaron en la prueba de reducción de metales son el consorcio A que está formado por las cuatro primeras cepas identificadas *Shigella serogroups A,B y C*, *Povidencia rustigianii*, *Morganella morgarii biogp* y *Xenorhabdus nematophilis*, el consorcio B por las otras cinco *Enterobacter agglomerans complex*, *Shigella serogroups C*, *Xenorhabdus nematophilis* y *Proteus vulgaris*, el consorcio A+B está formado por todas las cepas identificadas.

Para verificar la capacidad que tienen los consorcios de reducir ciertos metales se someten a los mismos a una prueba de reducción de metales esta prueba consiste en la elaboración de un mix de metales de concentración conocida en este caso 4000 ppb aproximadamente a este mix se le los reactivos para crear un medio mínimo nutritivo optimo y posteriormente se inoculan los consorcios y se incuban por quince días.

Tabla 5-4: PRUEBA DE REDUCCIÓN DE METALES APLICANDO CONSORCIOS

Metal	Consortio	Concentración Inicial (ppb)	Concentración en Biomasa (ppb)	Concentración Final (ppb)	% de Reducción
Al	A	4001,02	976,73	3024,29	24,41
	B		1072,79	2928,23	26,81
	A+B		1456,59	2544,43	36,41
As	A	4000,03	394,88	3605,15	9,87
	B		324,16	3675,87	8,10
	A+B		483,99	3516,04	12,10
Ba	A	4001,02	1122,08	2878,94	28,04
	B		1055,24	2945,78	26,37
	A+B		1247,43	2753,59	31,18
Cd	A	4000,13	521,32	3478,81	13,03
	B		534,06	3466,07	13,35
	A+B		602,45	3397,68	15,06
Cr	A	4001,84	605,41	3396,43	15,13
	B		647,45	3354,39	16,18
	A+B		680,32	3321,52	17,00
Cu	A	3998,64	560,42	3438,22	14,02
	B		572,14	3426,5	14,31
	A+B		602,05	3396,59	15,06
Hg	A	4001,26	380,02	3621,24	9,50
	B		372,15	3629,11	9,30
	A+B		396,58	3604,68	9,91
Ni	A	4001,31	622,14	3379,17	15,55
	B		634,02	3367,29	15,85
	A+B		698,89	3302,42	17,47
Pb	A	3998,92	824,34	3174,58	20,61
	B		831,15	3167,77	20,78
	A+B		901,02	3097,90	22,53
Se	A	4000,36	201,07	3799,29	5,03
	B		225,32	3775,04	5,63
	A+B		289,78	3710,58	7,24

Realizado por: MIRANDA, J. 2014

Se realizan las lecturas para determinar la concentración de metales en la biomasa producida por los consorcios. La concentración final se determina restando la concentración de la biomasa de la concentración inicial. El consorcio que tuvo mayor reducción de metales fue el consorcio A+B los metales que más bajaron su concentración en porcentaje son primeramente el grupo formado el Al con (36,41 %), Ba (31,18 %) y Pb (22,53 %), seguidos por Ni (17,47 %), Cr y Cu (17,00 %), Cd (15,06

%) y finalmente los que menos porcentaje de reducción tuvieron son el As (12,10 %), Hg (9,91%) y Se (7,24 %) estos resultados se ven reflejados en la tabla 6-4.

La prueba de reducción de metales nos permitió conocer el comportamiento que tienen los consorcios en un medio líquido para reducir metales por esta razón los consorcios también pueden ser usados en el tratamiento de aguas contaminadas.

4.7. Análisis de datos del diseño experimental

4.7.1. Obtención del sedimento sujeto a remediación con consorcios bacterianos.

La población total (N) a estudiar fue de 20 kilogramos de sedimento obtenido de la planta de tratamiento y del residual de muestras del LAB-CESTTA recolectado durante un periodo de seis meses, el sedimento fue homogenizado para el proceso de remediación y repartido en cantidades iguales en las nueve unidades de control y en el blanco.

4.7.2. Caracterización y parámetros de análisis del sedimento.

Para la caracterización del sedimento en cada uno de los tratamientos se tomó en cuenta los siguientes parámetros, Hidrocarburos Totales de Petróleo (THP) y los metales (Al) Aluminio, (As) Arsénico, (Ba) Bario, (Cd) Cadmio, (Cr) Cromo, (Cu) Cobre, (Hg) Mercurio, (Ni) Níquel, (Pb) Plomo, (Se) Selenio, aerobios, pH y humedad.

Los análisis se realizaron de la siguiente forma la unidad de control a la que no se le aplica ningún tratamiento y las unidades de control con cada uno de los tratamientos se analiza al inicio a los 20 a los 40 días y finalmente a los 60 días.

Los parámetros de control pH, humedad, y temperatura se los realizó tres veces por semana, el crecimiento bacteriano un vez por semana durante todo el proceso de biorremediación.

4.7.3. Análisis de Unidades de control

La caracterización inicial del sedimento se hizo con la totalidad del sedimento y se ve reflejado en la tabla 7-4, en la tabla se muestran además los análisis del sedimento de la unidad a la que no se le realizó ningún tratamiento.

Debido a que no existe una norma específica en el que se señale los límites que debe tener un sedimento sometido a un proceso de remediación se toma como referencia a la Tabla 3. Criterios de Remediación o Restauración del Suelo del Texto Unificado de Legislación Ambiental para elegir los parámetros mínimos que deberían analizarse.

Como se puede apreciar en la tabla 7-4 las concentraciones se mantienen estables durante el proceso de remediación.

Tabla 6-4: CARACTERIZACIÓN DEL SEDIMENTO A TRATAR Y UNIDAD DE CONTROL SIN TRATAMIENTO

Parámetro	Tiempo (Días)				Unidades
	1	20	40	60	
Al	13127	13126,62	13126,03	13124,12	mg/Kg
As	10,9	10,5	10,3	10,22	mg/Kg
Ba	224,32	223,25	223,05	222,96	mg/Kg
Cd	30,06	30,02	29,92	29,9	mg/Kg
Cr	1,12	1,06	1,02	1,02	mg/Kg
Cu	728,15	726,08	726,15	726,02	mg/Kg
Hg	1,5	1,42	1,4	1,38	mg/Kg
Ni	32,81	32,15	32,15	31,99	mg/Kg
Pb	134	133,45	132,85	132,22	mg/Kg
Se	52,25	52,04	52,01	51,85	mg/Kg
TPH	5428,41	5401,14	5400,23	5386,18	mg/Kg
Aerobios	5*10 ⁴	4*10 ⁴	4*10 ⁴	3*10 ⁴	UFC/g
pH	6,54	6,52	6,55	6,54	Unidades de pH
Humedad	50	51	52	55,1	%

Realizado por: MIRANDA, J. 2014

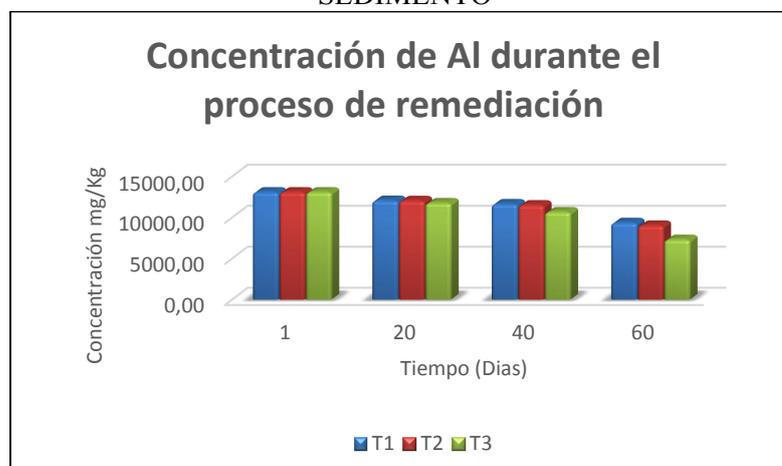
Tabla 7-4: VARIACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ALUMINIO EN EL PROCESO DE REMEDIACIÓN

Tiempo	Consortio A	Consortio B	Consortio A+B
	T1	T2	T3
	Concentración ppm		
20 Días	12097,09	12067,58	11803,99
40 Días	11681,08	11541,08	10696,72
60 Días	9393,03	9066,33	7333,69

Realizado por: MIRANDA, J. 2014

Se realizaron lecturas de la concentración de Al a los 20, 40 y 60 días que duró el proceso de remediación para cada uno de los tratamientos aplicados tal como se observa en la tabla 8-4. El tratamiento que posee una mayor reducción de aluminio es el T3 al cual se le aplicó la mezcla de los consorcios A+B, la concentración de Al se reduce de 13127 ppm a 7333,69 ppm.

Gráfico 1-4: LECTURA DE CONCENTRACIÓN DE ALUMINIO EN EL SEDIMENTO



Realizado por: MIRANDA, J. 2014

A medida que transcurre el tiempo de aplicación de los tratamientos T1, T2 y T3 se observa en el gráfico 1-4 que existe una tendencia decreciente en la concentración de Al, siendo el tratamiento T3 el que presenta una reducción más alta a los 60 días.

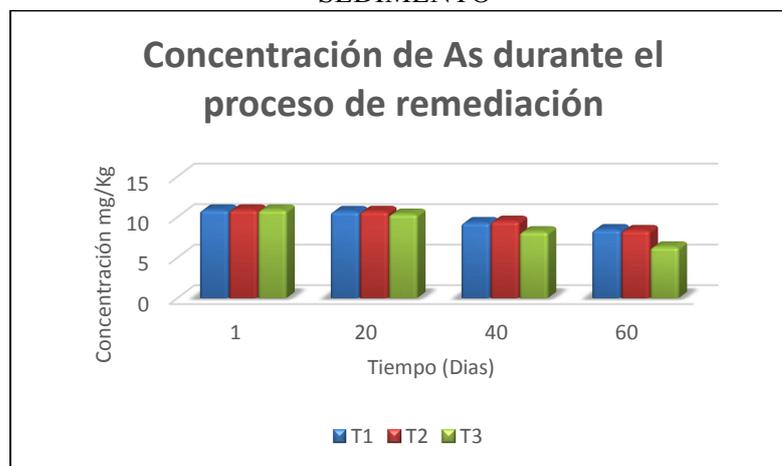
Tabla 8-4: VARIACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ARSÉNICO EN EL PROCESO DE REMEDIACIÓN

Tiempo	Consortio A	Consortio B	Consortio A+B
	T1	T2	T3
	Concentración ppm		
20 Días	10,71	10,72	10,38
40 Días	9,34	9,51	8,21
60 Días	8,47	8,36	6,34

Realizado por: MIRANDA, J. 2014

Se realizaron lecturas de la concentración de As a los 20, 40 y 60 días que duró el proceso de remediación para cada uno de los tratamientos aplicados tal como se observa en la tabla 9-4. El tratamiento que posee una mayor reducción de arsénico es el T3 al cual se le aplico la mezcla de los consorcios A+B, la concentración de As se reduce de 10,9 ppm a 6,34 ppm una vez terminado el proceso de remediación.

Gráfico 2-4: LECTURA DE CONCENTRACIÓN DE ARSÉNICO EN EL SEDIMENTO



Realizado por: MIRANDA, J. 2014

A medida que transcurre el tiempo de aplicación de los tratamientos T1, T2 y T3 se observa en el gráfico 2-4 que existe una tendencia decreciente en la concentración de As, siendo el tratamiento T3 el que presenta una reducción más alta del mismo a los 60 días.

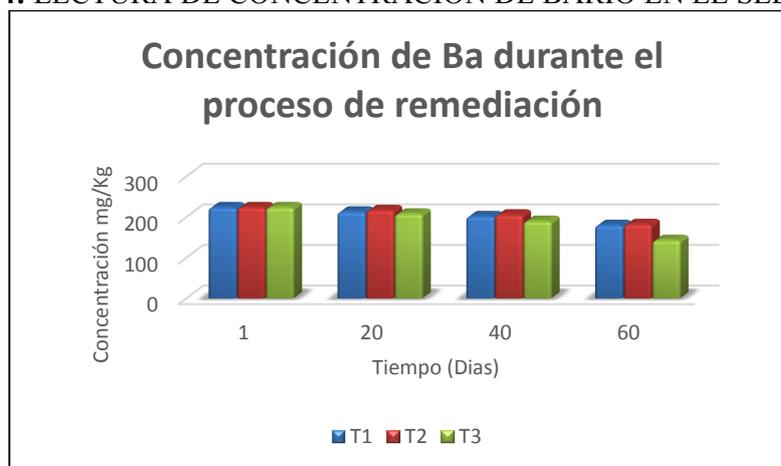
Tabla 9-4: VARIACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE BARIO EN EL PROCESO DE REMEDIACIÓN

Tiempo	Consortio A	Consortio B	Consortio A+B
	T1	T2	T3
	Concentración ppm		
20 Días	213,70	217,19	208,50
40 Días	202,27	206,24	190,69
60 Días	180,64	182,81	143,40

Realizado por: MIRANDA, J. 2014

Se realizaron lecturas de la concentración de Ba a los 20, 40 y 60 días que duró el proceso de remediación para cada uno de los tratamientos aplicados tal como se observa en la tabla 10-4. El tratamiento que posee una mayor reducción de bario es el T3 al cual se le aplicó la mezcla de los consorcios A+B, la concentración de Ba se reduce de 224,32 ppm a 143,40 ppm.

Gráfico 3-4: LECTURA DE CONCENTRACIÓN DE BARIO EN EL SEDIMENTO



Realizado por: MIRANDA, J. 2014

A medida que transcurre el tiempo de aplicación de los tratamientos T1, T2 y T3 se observa en el gráfico 3-4 que existe una tendencia decreciente en la concentración de Ba, siendo el tratamiento T3 el que presenta una reducción más alta del mismo a los 60 días.

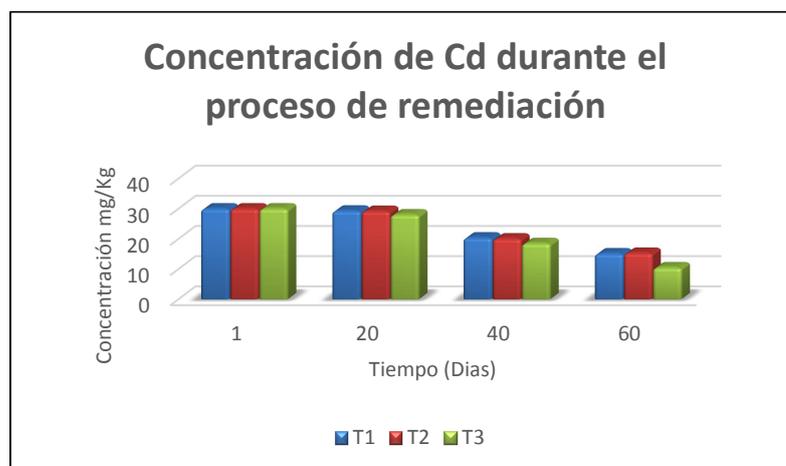
Tabla 11-4: VARIACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CADMIO EN EL PROCESO DE REMEDIACIÓN

Tiempo	Consortio A	Consortio B	Consortio A+B
	T1	T2	T3
	Concentración ppm		
20 Días	29,36	29,27	28,08
40 Días	20,45	20,12	18,57
60 Días	15,18	15,36	10,55

Realizado por: MIRANDA, J. 2014

Se realizaron lecturas de la concentración de Cd a los 20, 40 y 60 días que duró el proceso de remediación para cada uno de los tratamientos aplicados tal como se observa en la tabla 11-4. El tratamiento que posee una mayor reducción de cadmio es el T3 al cual se le aplico la mezcla de los consorcios A+B, la concentración de Cd se reduce de 30,06 ppm a 10,55 ppm.

Gráfico 4-4: LECTURA DE CONCENTRACIÓN DE CADMIO EN EL SEDIMENTO



Realizado por: MIRANDA, J. 2014

A medida que transcurre el tiempo de aplicación de los tratamientos T1, T2 y T3 se observa en el gráfico 4-4 que existe una tendencia decreciente en la concentración de Cd, siendo el tratamiento T3 el que presenta una reducción más alta del mismo a los 60 días.

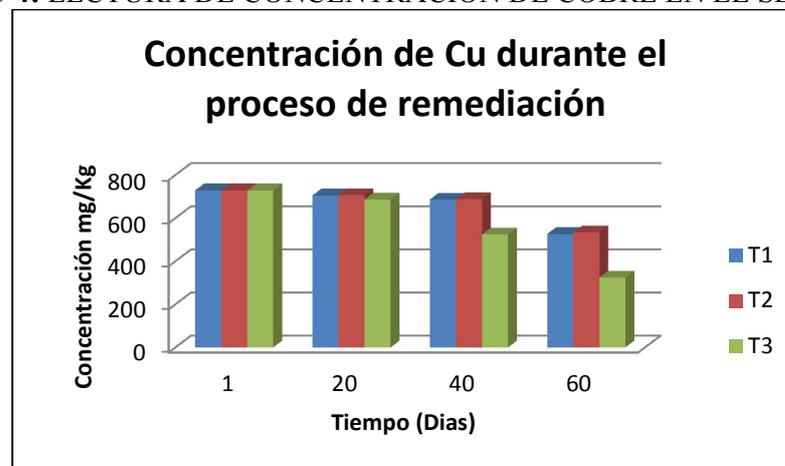
Tabla 12-4: VARIACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE COBRE EN EL PROCESO DE REMEDIACIÓN

Tiempo	Consortio A	Consortio B	Consortio A+B
	T1	T2	T3
	Concentración ppm		
20 Días	704,80	706,89	686,69
40 Días	685,87	687,45	523,63
60 Días	526,36	533,64	324,13

Realizado por: MIRANDA, J. 2014

Se realizaron lecturas de la concentración de Cu a los 20, 40 y 60 días que duró el proceso de remediación para cada uno de los tratamientos aplicados tal como se observa en la tabla 12-4. El tratamiento que posee una mayor reducción de cobre es el T3 al cual se le aplicó la mezcla de los consorcios A+B, la concentración de Cu se reduce de 728,15 ppm a 324,13 ppm.

Gráfico 5-4: LECTURA DE CONCENTRACIÓN DE COBRE EN EL SEDIMENTO



Realizado por: MIRANDA, J. 2014

A medida que transcurre el tiempo de aplicación de los tratamientos T1, T2 y T3 se observa en el gráfico 5-4 que existe una tendencia decreciente en la concentración de Cu, siendo el tratamiento T3 el que presenta una reducción más alta del mismo.

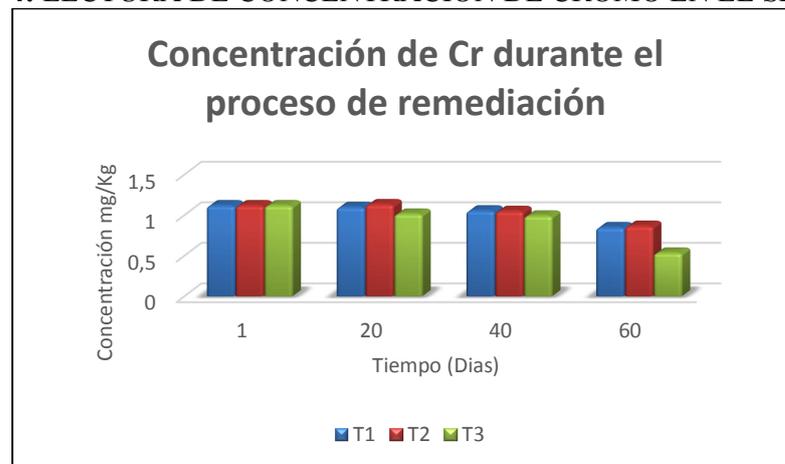
Tabla 13-4: VARIACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CROMO EN EL PROCESO DE REMEDIACIÓN

Tiempo	Consortio A	Consortio B	Consortio A+B
	T1	T2	T3
	Concentración ppm		
20 Días	1,10	1,13	1,02
40 Días	1,06	1,05	0,99
60 Días	0,85	0,87	0,54

Realizado por: MIRANDA, J. 2014

Se realizaron lecturas de la concentración de Cr a los 20, 40 y 60 días que duró el proceso de remediación para cada uno de los tratamientos aplicados tal como se observa en la tabla 13-4. El tratamiento que posee una mayor reducción de cromo es el T3 al cual se le aplico la mezcla de los consorcios A+B, la concentración de Cr se reduce de 1,12 ppm a 0,54 ppm.

Gráfico 6-4: LECTURA DE CONCENTRACIÓN DE CROMO EN EL SEDIMENTO



Realizado por: MIRANDA, J. 2014

A medida que transcurre el tiempo de aplicación de los tratamientos T1, T2 y T3 se observa en el gráfico 6-4 que existe una tendencia decreciente en la concentración de Cr, siendo el tratamiento T3 el que presenta una reducción más alta del mismo.

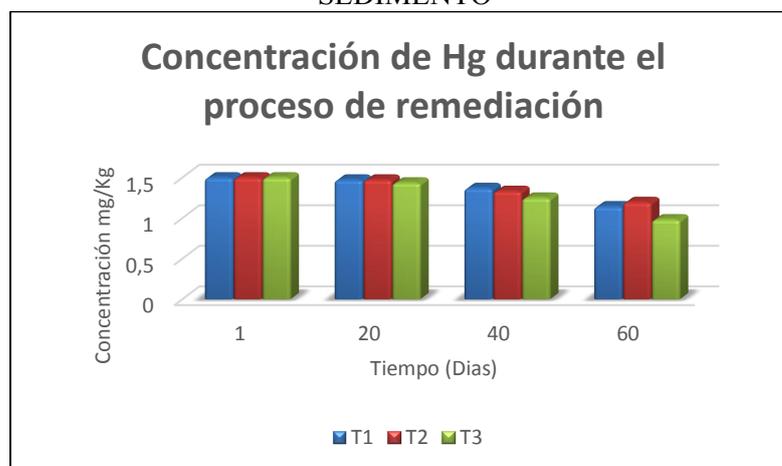
Tabla 14-4: VARIACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE MERCURIO EN PROCESO DE REMEDIACIÓN

Tiempo	Consortio A	Consortio B	Consortio A+B
	T1	T2	T3
	Concentración ppm		
20 Días	1,47	1,47	1,44
40 Días	1,37	1,33	1,25
60 Días	1,14	1,20	0,98

Realizado por: MIRANDA, J. 2014

Se realizaron lecturas de la concentración de Hg a los 20, 40 y 60 días que duró el proceso de remediación para cada uno de los tratamientos aplicados tal como se observa en la tabla 14-4. El tratamiento que posee una mayor reducción de mercurio es el T3 al cual se le aplico la mezcla de los consorcios A+B, la concentración de Hg se reduce de 1,5 ppm a 0,98 ppm.

Gráfico 7-4: LECTURA DE CONCENTRACIÓN DE MERCURIO EN EL SEDIMENTO



Realizado por: MIRANDA, J. 2014

A medida que transcurre el tiempo de aplicación de los tratamientos T1, T2 y T3 se observa en el gráfico 7-4 que existe una tendencia decreciente en la concentración de Hg, siendo el tratamiento T3 el que presenta una reducción más alta del mismo.

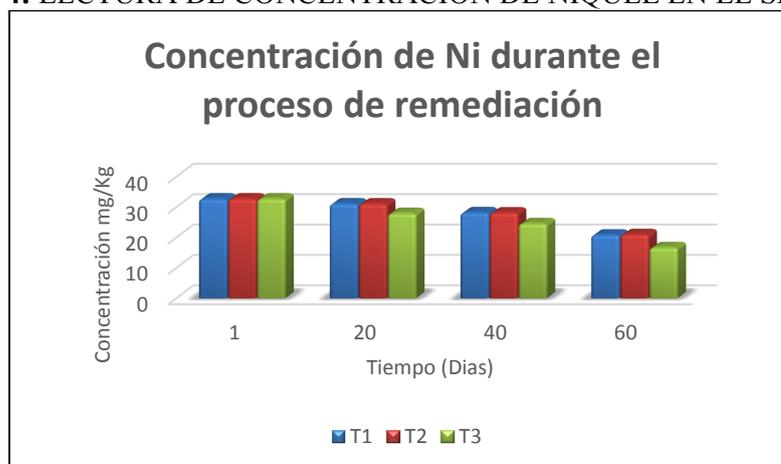
Tabla 15-4: VARIACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE NÍQUEL EN EL PROCESO DE REMEDIACIÓN

Tiempo	Consortio A	Consortio B	Consortio A+B
	T1	T2	T3
	Concentración ppm		
20 Días	31,20	31,17	28,02
40 Días	28,27	28,21	24,66
60 Días	20,93	21,07	16,76

Realizado por: MIRANDA, J. 2014

Se realizaron lecturas de la concentración de Ni a los 20, 40 y 60 días que duró el proceso de remediación para cada uno de los tratamientos aplicados tal como se observa en la tabla 15-4. El tratamiento que posee una mayor reducción de níquel es el T3 al cual se le aplico la mezcla de los consorcios A+B, la concentración de Ni se reduce de 32,81 ppm a 16,76 ppm.

Gráfico 8-4: LECTURA DE CONCENTRACIÓN DE NIQUEL EN EL SEDIMENTO



Realizado por: MIRANDA, J. 2014

A medida que transcurre el tiempo de aplicación de los tratamientos T1, T2 y T3 se observa en el gráfico 8-4 que existe una tendencia decreciente en la concentración de Ni, siendo el tratamiento T3 el que presenta una reducción más alta del mismo.

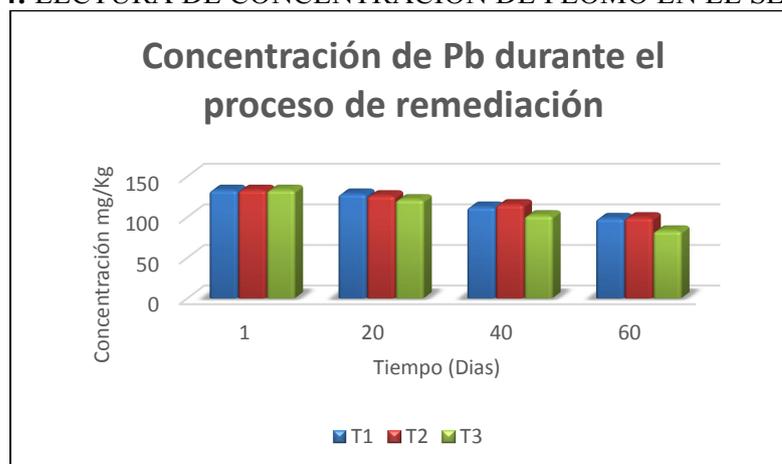
Tabla 16-4: VARIACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PLOMO EN EL PROCESO DE REMEDIACIÓN

Tiempo	Consortio A	Consortio B	Consortio A+B
	T1	T2	T3
	Concentración ppm		
20 Días	128,78	126,56	121,77
40 Días	112,68	115,62	102,05
60 Días	98,65	99,53	83,27

Realizado por: MIRANDA, J. 2014

Se realizaron lecturas de la concentración de Pb a los 20, 40 y 60 días que duró el proceso de remediación para cada uno de los tratamientos aplicados tal como se observa en la tabla 16-4. El tratamiento que posee una mayor reducción de plomo es el T3 al cual se le aplico la mezcla de los consorcios A+B, la concentración de Pb se reduce de 133,45 ppm a 83,27 ppm.

Gráfico 9-4: LECTURA DE CONCENTRACIÓN DE PLOMO EN EL SEDIMENTO



Realizado por: MIRANDA, J. 2014

A medida que transcurre el tiempo de aplicación de los tratamientos T1, T2 y T3 se observa en el gráfico 9-4 que existe una tendencia decreciente en la concentración de Pb, siendo el tratamiento T3 el que presenta una reducción más alta del mismo.

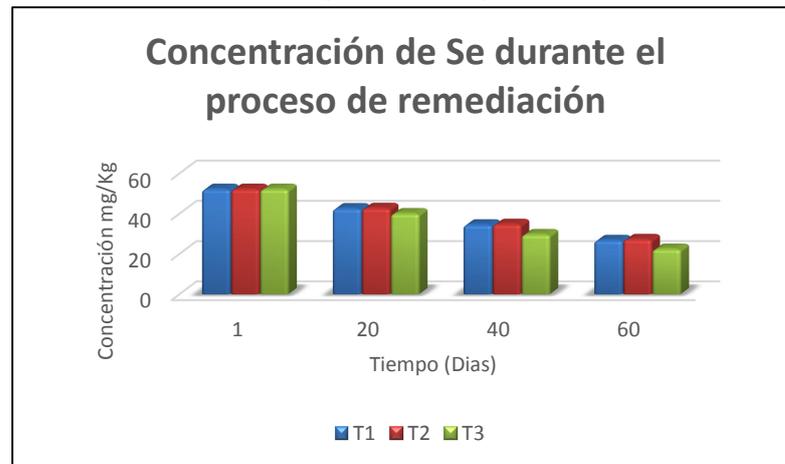
Tabla 17-4: VARIACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE SELENIO EN EL PROCESO DE REMEDIACIÓN

Tiempo	Consortio A	Consortio B	Consortio A+B
	T1	T2	T3
	Concentración ppm		
20 Días	42,62	42,77	40,16
40 Días	34,58	34,81	29,76
60 Días	26,83	27,31	22,50

Realizado por: MIRANDA, J. 2014

Se realizaron lecturas de la concentración de Se a los 20, 40 y 60 días que duró el proceso de remediación para cada uno de los tratamientos aplicados tal como se observa en la tabla 17-4. El tratamiento que posee una mayor reducción de selenio es el T3 al cual se le aplico la mezcla de los consorcios A+B, la concentración de Se se reduce de 52,25 ppm a 22,50 ppm.

Gráfico 10-4: LECTURA DE CONCENTRACIÓN DE SELENIO EN EL SEDIMENTO



Realizado por: MIRANDA, J. 2014

A medida que transcurre el tiempo de aplicación de los tratamientos T1, T2 y T3 se observa en el gráfico 10-4 que existe una tendencia decreciente en la concentración de Se, siendo el tratamiento T3 el que presenta una reducción más alta del mismo.

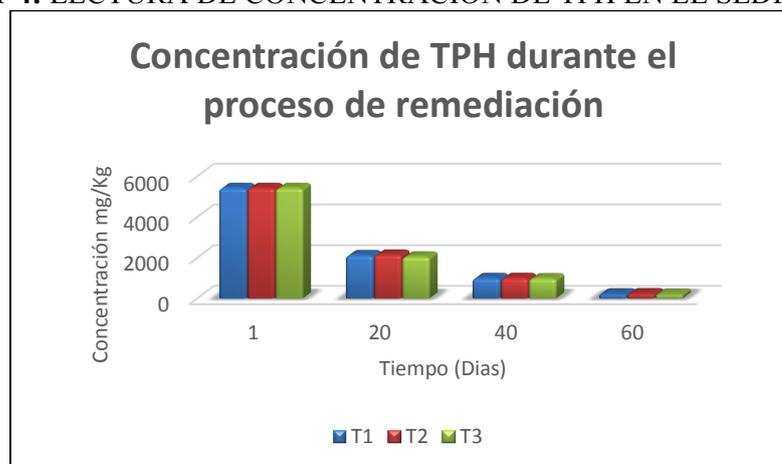
Tabla 18-4: VARIACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE TPH EN EL PROCESO DE REMEDIACIÓN

Tiempo	Consortio A	Consortio B	Consortio A+B
	T1	T2	T3
	Concentración ppm		
20 Días	2126,14	2154,14	2060,10
40 Días	1004,21	1006,31	990,47
60 Días	226,30	234,49	209,45

Realizado por: MIRANDA, J. 2014

Se realizaron lecturas de la concentración de TPH a los 20, 40 y 60 días que duró el proceso de remediación para cada uno de los tratamientos aplicados tal como se observa en la tabla 18-4. El tratamiento que posee una mayor reducción de TPH es el T3 al cual se le aplicó la mezcla de los consorcios A+B, la concentración de TPH se reduce de 5428,41 ppm a 209,45 ppm.

Gráfico 11-4: LECTURA DE CONCENTRACIÓN DE TPH EN EL SEDIMENTO



Realizado por: MIRANDA, J. 2014

A medida que transcurre el tiempo de aplicación de los tratamientos T1, T2 y T3 se observa en el gráfico 11-4 que existe una tendencia decreciente en la concentración de TPH, siendo todos los tratamientos parecidos en cuanto a la reducción de TPH.

4.8. Seguimiento de las variables de control

4.8.1. Temperatura y humedad ambiental

Se registraron los valores de temperatura y humedad ambiental durante el tiempo de tratamiento con los consorcios bacterianos obteniéndose valores entre 16 - 23°C de temperatura y 36-59% de humedad

Estos valores no inciden y no son representativos en la investigación ya que los cambios que se dieron fueron paulatinos y los tratamientos no se vieron afectados. Los gráficos de los valores obtenidos se presentan a continuación.

Gráfico 12-4: VARIACIÓN DE TEMPERATURA DURANTE LA INVESTIGACIÓN



Realizado por: MIRANDA, J. 2014

Gráfico 13-4: VARIACIÓN DE LA HUMEDAD DURANTE LA INVESTIGACIÓN



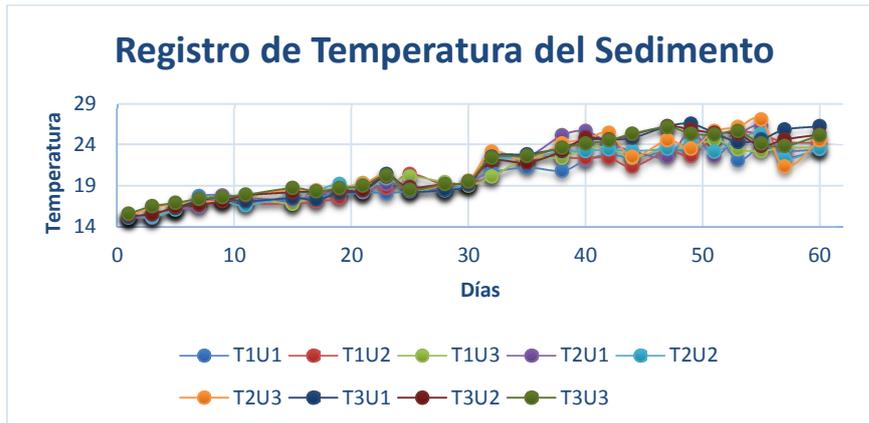
Realizado por: MIRANDA, J. 2014

4.8.2. Temperatura y humedad en tratamientos de biorremediación

Se registró el control de la humedad y temperatura durante 60 días que duró del proceso de biorremediación, ver Anexo 12 registro de temperaturas durante el proceso de biorremediación y Anexo 13 registro de humedad durante el proceso de biorremediación

La temperatura en las unidades experimentales como se observa en el Grafico 14-4. Registro de temperatura, se inicia con una temperatura de 15,1 °C; una vez realizada la adición de cada uno de los inóculos bacterianos en la primera semana la temperatura va aumentando gradualmente en cada una de las unidades experimentales y en cada tratamiento. La temperatura máxima registrada es de 27 °C en el día 55 en el tratamiento T2U3.

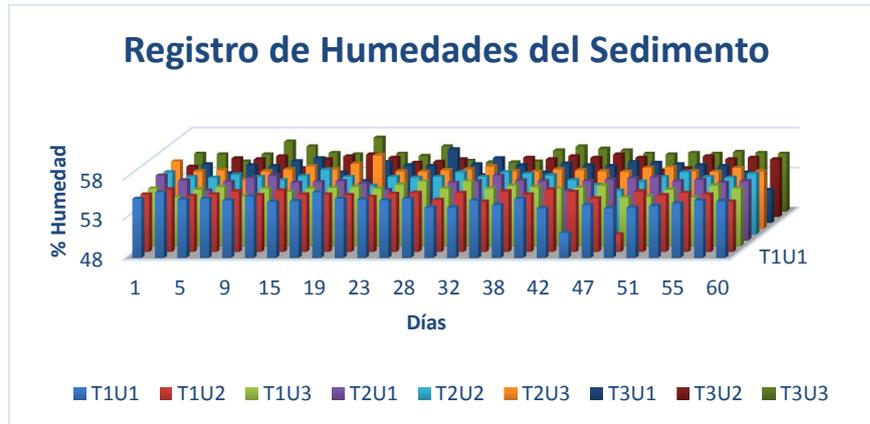
Gráfico 14-4: TEMPERATURAS DE LAS UNIDADES EXPERIMENTALES



Realizado por: MIRANDA, J. 2014

La humedad en las unidades experimentales presenta valores entre 50,2 % a 57,2 %, esta se mantiene estable a lo largo del proceso de remediación. La media de humedad registrada durante los 30 días es de 55,11 %, el valor máximo alcanzado es de 57,2 % en el día 19 como se observa en el gráfico 15-4 Registro de Humedad en unidades experimentales.

Gráfico 15-4: PORCENTAJE DE HUMEDAD DE LAS UNIDADES EXPERIMENTALES



Realizado por: MIRANDA, J. 2014

4.8.3. pH en tratamientos de biorremediación

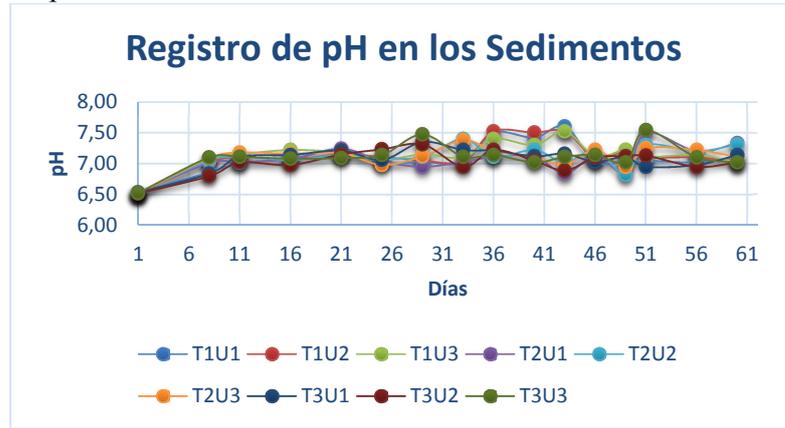
El pH del sedimento durante el tratamiento de biorremediación se mantiene fluctuando entre 6,52 y 7,60 unidades de pH como se evidencia en la Tabla 19-4 y Grafico 16-4.

Tabla 19-4: pH EN LAS UNIDADES DE CONTROL DE LOS TRATAMIENTOS

DIA	T1U1	T1U2	T1U3	T2U1	T2U2	T2U3	T3U1	T3U2	T3U3
1	6,54	6,53	6,52	6,54	6,53	6,52	6,54	6,52	6,53
8	6,86	7,02	7,08	7,01	7,05	7,09	6,84	6,80	7,10
11	7,01	7,11	7,15	7,03	7,11	7,18	7,11	7,02	7,11
16	7,08	7,07	7,22	7,07	7,06	7,16	7,14	6,98	7,08
21	7,24	7,15	7,18	7,24	7,14	7,17	7,21	7,15	7,09
25	7,02	7,11	7,06	7,04	7,09	6,98	7,06	7,23	7,14
29	7,03	7,05	7,15	6,95	7,11	7,12	7,35	7,31	7,47
33	7,02	7,04	7,10	7,03	7,40	7,38	7,22	6,95	7,11
36	7,50	7,52	7,40	7,11	7,11	7,21	7,21	7,22	7,14
40	7,42	7,50	7,30	7,12	7,22	7,11	7,12	7,05	7,02
43	7,60	7,52	7,52	6,84	7,02	6,98	7,16	6,89	7,11
46	7,03	7,10	7,12	7,12	7,21	7,22	7,03	7,10	7,14
49	7,04	7,20	7,22	6,85	6,82	6,95	7,11	7,12	7,02
51	7,05	7,10	7,11	7,50	7,30	7,25	6,95	7,13	7,54
56	7,02	7,1	7,14	7,2	7,2	7,22	6,98	6,95	7,1
60	7,11	7,02	7,02	7,33	7,31	7,11	7,14	7,02	7,02

Realizado por: MIRANDA, J. 2014

Gráfico 16-4: pH EN LAS UNIDADES DE CONTROL DE LOS TRATAMIENTOS



Realizado por: MIRANDA, J. 2014

4.8.4. Crecimiento bacteriano en tratamientos de biorremediación

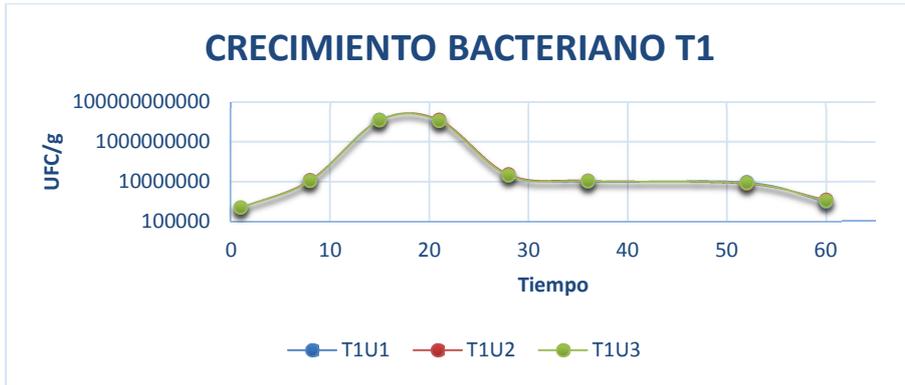
Se realizan un total de 8 mediciones de crecimiento bacteriano en cada una de las unidades experimentales y tratamientos durante el proceso de biorremediación. Se observa un crecimiento exponencial en cada una de las unidades una vez que se realiza la inoculación durante y al final del experimento como se muestra en la tabla 20-4 y gráfico 17-4,18-4 y 19-4. El máximo valor registrado es de $2,14 \times 10^{10}$ en el T3U3 en el día 15.

Tabla 20-4: CONTEO BACTERIANO EN LAS UNIDADES DE CONTROL DE LOS TRATAMIENTOS

Día	T1U1	T1U2	T1U3	T2U1	T2U2	T2U3	T3U1	T3U2	T3U3
1	5,00E+0 5	5,00E+0 5	5,00E+0 5	5,00E+0 5	5,00E+0 5	5,00E+0 5	5,00E+0 5	5,00E+0 5	5,00E+0 5
8	1,13E+0 7	1,16E+0 7	1,10E+0 7	1,21E+0 7	1,30E+0 7	1,23E+0 7	2,79E+0 7	2,87E+0 7	2,56E+0 7
15	1,18E+1 0	1,15E+1 0	1,14E+1 0	1,27E+1 0	1,25E+1 0	1,28E+1 0	2,01E+1 0	2,06E+1 0	2,14E+1 0
21	1,12E+1 0	1,18E+1 0	1,09E+1 0	1,11E+1 0	1,17E+1 0	1,20E+1 0	1,94E+1 0	1,86E+1 0	2,01E+1 0
28	2,20E+0 7	2,25E+0 7	2,06E+0 7	5,00E+0 7	5,13E+0 7	5,03E+0 7	6,52E+0 7	5,96E+0 7	7,25E+0 7
36	1,00E+0 7	1,10E+0 7	1,06E+0 7	2,11E+0 7	2,18E+0 7	2,01E+0 7	4,21E+0 7	3,72E+0 7	4,53E+0 7
52	9,00E+0 06	8,00E+0 6	8,40E+0 6	2,02E+0 7	1,94E+0 7	1,92E+0 7	3,52E+0 7	3,14E+0 7	3,58E+0 7
60	1,00E+0 06	1,20E+0 6	1,10E+0 6	1,80E+0 6	2,00E+0 6	2,10E+0 6	6,30E+0 6	8,20E+0 6	9,60E+0 6

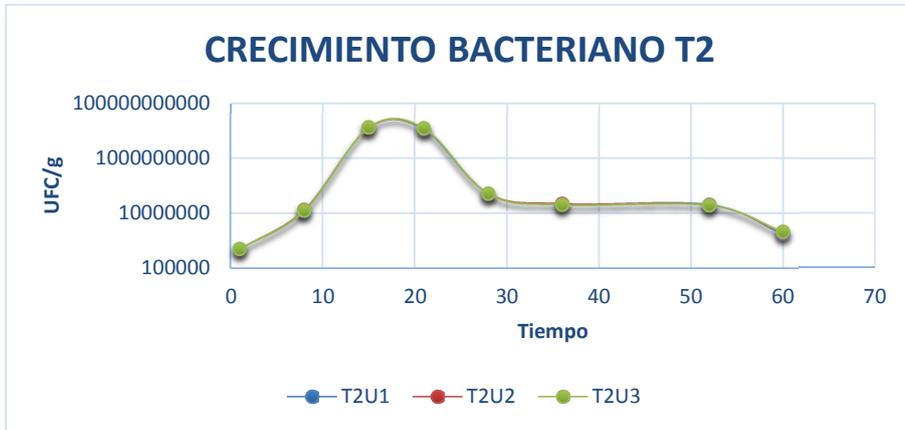
Realizado por: MIRANDA, J. 2014

Gráfico 17-4: CRECIMIENTO BACTERIANO TRATAMIENTO 1



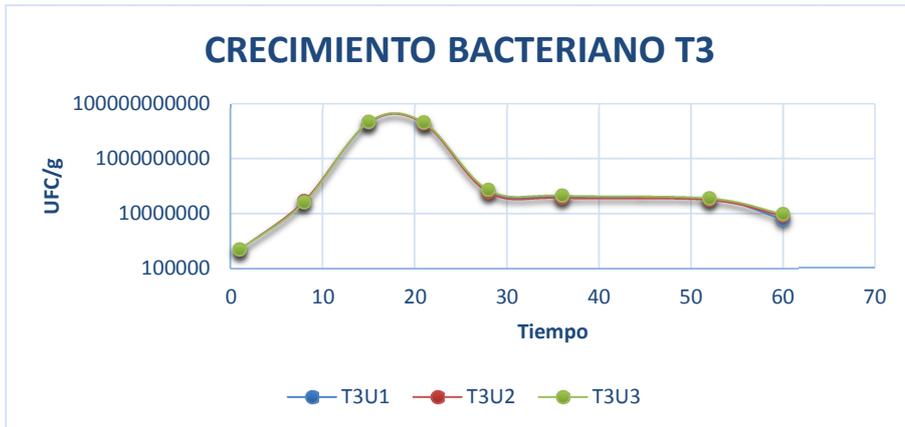
Realizado por: MIRANDA, J. 2014

Gráfico 18-4: CRECIMIENTO BACTERIANO TRATAMIENTO 2



Realizado por: MIRANDA, J. 2014

Gráfico 19-4: CRECIMIENTO BACTERIANO TRATAMIENTO 3



Realizado por: MIRANDA, J. 2014

4.9. Porcentaje de eficacia del proceso de biorremediación

Los porcentajes de eficiencia del tratamiento 3 al que se le aplicó el consorcio A+B y que nos proporcionó mejores resultados se observa en la tabla XXIII.

La eficiencia en la reducción de TPH fue de 96,14 %, y la eficiencia en la reducción de metales fue para el Cd con un 64,90 % seguido por el Se con un 56,94 %, Cu con un 55,49%, Cr con un 52,08 %, Ni con un 48,92 %, As con un 41,87 %, Al con un 44,13 %, Pb con un 37,86 % y finalmente el Ba con 36,07 %.

Tabla 21-4: PORCENTAJE DE EFICACIA DEL PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN EN EL T3

PARÁMETRO	EFICACIA (%)
Al	44,13
As	41,87
Ba	36,07
Cd	64,90
Cr	52,08
Cu	55,49
Hg	34,44
Ni	48,92
Pb	37,86
Se	56,94
TPH	96,14

Realizado por: MIRANDA, J. 2014

CONCLUSIONES

- ✓ Se conformaron tres consorcios bacterianos nativos: el consorcio A conformado por 4 cepas, el consorcio B conformado por 5 cepas y finalmente el consorcio A+B conformado por 9 cepas los cuales demostraron tener capacidad para biorremediar los metales presentes en los sedimentos generados en el LAB-CESTTA. La caracterización física química y microbiológica de los sedimentos demostró que existe la presencia de diversos contaminantes tales como los metales: Al, As, Ba, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Se y TPH; la concentración de microorganismos nativos fue de 5×10^4 UFC/g lo que proporciono el material básico para el aislamiento de bacterias y posterior formación de los consorcios.
- ✓ La caracterización de la descarga de la planta de tratamiento del LAB-CESTTA demostró que los parámetros analizados se encontraron por debajo de los límites permisibles establecidos en la Tabla 11. Límites de descarga al sistema de alcantarillado público del Libro VI Anexo 1 del TULAS por lo tanto no fue necesario realizar un proceso de biorremediación en el efluente. Se aislaron en el laboratorio mediante procesos de purificación un total de 20 cepas bacterianas de las cuales 4 cepas correspondieron a la muestra de agua y las otras 16 cepas fueron aisladas de las muestras de sedimento de estas se seleccionaron nueve cepas bacterianas idóneas para el proceso de biorremediación mediante la aplicación de pruebas específicas para determinar la actividad emulsificante superior o igual a 3 UAE/mL, poder degradativo de hidrocarburos superior o igual al tubo +3 de la escala de Mc. Farland y antagonismo. La identificación de las características microscópicas realizadas a las cepas seleccionadas como idóneas para el proceso de biorremediación permitió conocer que los microorganismos eran del género *Bacillus* GRAM-, la aplicación de las pruebas bioquímicas permitió identificar las siguientes cepas *Shigella serogroups A,B y C*, *Pseudomonas rustigianii*, *Morganella morganii* biogp 1, *Xenorhabdus nematophilis*, *Enterobacter agglomerans complex*, *Shigella serogroups C* y *Proteus vulgaris*.

- ✓ Se probaron tres inóculos bacterianos denominados A, B y A+B a nivel de laboratorio en un medio mínimo nutritivo el cual contenía un mix de los metales objeto de estudio en una concentración de 4000 ppb durante 30 días, en el proceso de remediación se probaron los mismos inóculos bacterianos en los sedimentos generados en el LAB-CESTTA por un periodo de 60 días.

- ✓ Se pudo verificar que en el medio mínimo nutritivo el consorcio A presentó un porcentaje de reducción de Al 24,21 %, As 9,87 %, Ba 28,04 %, Cd 13,03 %, Cr 15,13 %, Cu 14,02 %, Hg 9,50 %, Ni 15,55 %, Pb 20,61 %, Se 5,03 %. El consorcio B presentó un porcentaje de reducción de Al 26,81 %, As 8,10 %, Ba 26,37 %, Cd 13,35 %, Cr 16,18 %, Cu 14,31 %, Hg 9,30 %, Ni 15,85 %, Pb 20,78 %, Se 5,63 % y el consorcio A+B presentó una reducción de Al 36,41 %, As 12,10 %, Ba 31,18 %, Cd 15,06 %, Cr 17,00 %, Cu 15,06 %, Hg 9,91 %, Ni 17,47 %, Pb 22,53 %, Se 7,24 % en función a estos datos se concluye que el consorcio más eficaz para la reducción de metales es el A+B.

- ✓ En función a las pruebas de reducción de contaminantes realizadas en los sedimentos generados en el LAB-CESTTA se seleccionó al consorcio A+B como el más efectivo ya que presentó los siguientes porcentajes de reducción; TPH 96,14 %, Cd 64,90 %, Se 56,94 %, Cu 55,49%, Cr 52,08 %, Ni 48,92 %, As 41,87 %, Al 44,13 %, Pb con un 37,86 %, Ba 36,07 %. Tras la realización de esta investigación se concluye que la aplicación de consorcios bacterianos nativos es una alternativa efectiva para la reducción de metales pesados e hidrocarburos totales de petróleo en sedimentos contaminados.

RECOMENDACIONES

- ✓ Este trabajo deja abierta la investigación y se recomienda hacer mayores estudios orientados a la reducción de metales pesados y otros contaminantes mediante la obtención de consorcios bacterianos nativos.
- ✓ Realizar profundos estudios en lo que se refiere a inmovilización de consorcios bacterianos en sustratos inertes para alcanzar una mayor degradación o absorción de contaminantes.
- ✓ A pesar de que las pruebas bioquímicas son una prueba rápida para la identificación de bacterias se recomienda utilizar otra técnica de identificación como es la identificación molecular ya que esta última nos brindara resultados más claros en cuanto al tipo de microorganismo con el que estamos trabajando.
- ✓ Usar el equipo de protección adecuado al momento de manipular microorganismos activados y masificados.
- ✓ Realizar mayores trabajos en descontaminación aplicando consorcios bacterianos nativos ya que estos son métodos amigables con el ambiente.

BIBLIOGRAFÍA

CASTELLS, X. Reciclaje de residuos industriales: residuos sólidos urbanos y fangos de depuradoras, Barcelona-España. Díaz de Santos. 2009, pp. 1262-1263.

ECUADOR, MINISTERIO DEL AMBIENTE DE LA REPÚBLICA DEL ECUADOR. Norma de calidad ambiental y de descarga de efluentes: Recurso agua. Texto Unificado de Legislación Ambiental Secundario. LIBRO VI. Anexo 1. Quito-Ecuador, 2003, pp. 40-43.

ECUADOR, MINISTERIO DEL AMBIENTE DE LA REPÚBLICA DEL ECUADOR. Norma de calidad ambiental del recurso suelo y criterios de remediación para suelos contaminados. Texto Unificado de Legislación Ambiental Secundario. LIBRO VI. Anexo 2. Quito-Ecuador. 2003, pp. 14-16.

JOSEPH, G.; COLWELL, L.; COLWELL, R.; Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. Department of Microbiology, Maryland-United States of America. s.e. 1990, pp. 305-315.

MORENO, M. Tratamientos biológicos de suelos contaminados: contaminación por hidrocarburos. Aplicación de hongos en tratamientos de biorrecuperación. Dpto Microbiología Molecular, Madrid-España. s.ed. 2004, pp. 103-118.

NIELSEN, A.; ALLARD, A. Organic Chemicals in the environment Mechanisms of degradation and transformation. 2nd edition, United States of America. CRC Press. 2011, pp. 3711-3723.

ROSALES M. Luis A. Biorremediación de suelos contaminados con aceite de automóvil con el hongo de pudrición blanca *Pleurotus ostreatus* (setas) en Durango. (Tesis) (Ing. C.G.Amb). Instituto Politécnico Nacional, Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, México DF-México. 2008, p. 97.

SANCHEZ, J. Fundamentos y aspectos microbiológicos, Oviedo-España. Universidad de Oviedo. 2010, pp. 12-15.

SERRANO A. Paola C. Obtención del consorcio bacteriano nativo del sedimento de la laguna de Colta del cantón Colta. (Tesis) (Ing. Btgia Amb). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Ciencias Químicas, Riobamba-Ecuador. 2014, p. 120.

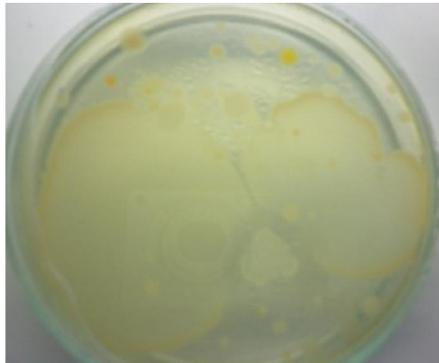
ANEXOS

Anexo A: PREPARACIÓN Y PESAJE DE MEDIOS DE CULTIVO



Realizado por: MIRANDA, J. 2014

Anexo B: CAJA CON COLONIAS BACTERIANAS



Realizado por: MIRANDA, J. 2014

Anexo C: ESTERILIZACIÓN DE MEDIOS MÍNIMOS NUTRITIVOS



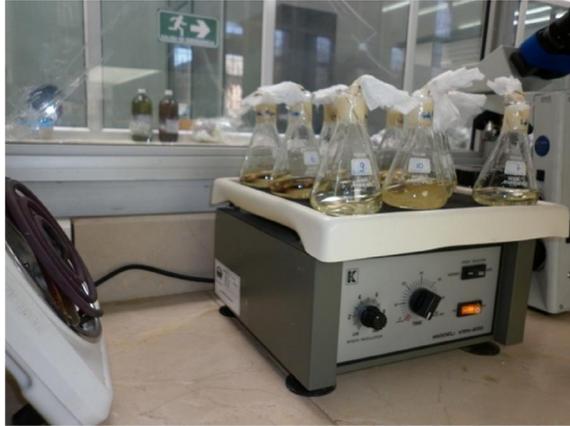
Realizado por: MIRANDA, J. 2014

Anexo D: INOCULACIÓN DE CEPAS



Realizado por: MIRANDA, J. 2014

Anexo E: AGITACIÓN DE LOS MEDIOS EN LA PRUEBA DE PODER DEGRADATIVO



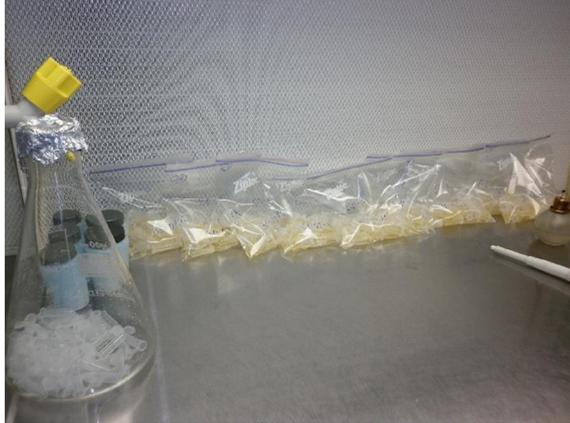
Realizado por: MIRANDA, J. 2014

Anexo F: INCUBACIÓN DE MEDIOS CON CEPAS



Realizado por: MIRANDA, J. 2014

Anexo G: ELABORACIÓN Y ROTULACIÓN DE BANCOS PRIMARIOS Y SECUNDARIOS



Realizado por: MIRANDA, J. 2014

Anexo H: ALMACENAMIENTO DE BANCOS PRIMARIOS Y SECUNDARIOS



Realizado por: MIRANDA, J. 2014

Anexo I: INOCULACIÓN DE CEPAS EN PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE IDENTIFICACIÓN



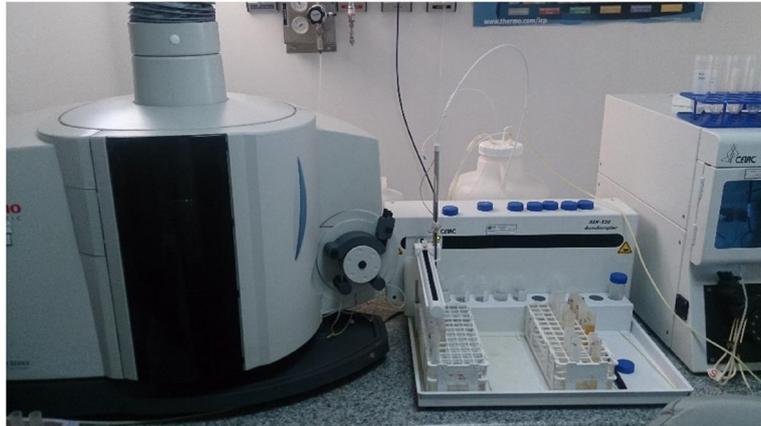
Realizado por: MIRANDA, J. 2014

Anexo J: TOMA DE MUESTRAS DE SEDIMENTOS DE UNIDADES DE CONTROL



Realizado por: MIRANDA, J. 2014

Anexo K: LECTURA DE METALES EN EQUIPO ICP



Realizado por: MIRANDA, J. 2014

Anexo L: REGISTRO DE TEMPERATURAS DURANTE EL PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN

Día	T1U1	T1U2	T1U3	T2U1	T2U2	T2U3	T3U1	T3U2	T3U3
1	15,1	15,3	15,2	15,2	15,5	15,4	15,2	15,4	15,6
3	15,7	15,5	15,4	15,1	15,2	16,2	15,6	15,5	16,5
5	16,2	16,1	16,3	16,1	16,1	16,9	16,3	16,4	16,9
7	17,7	17,4	17,4	16,4	17,4	17,1	17,2	16,7	17,4
9	17,8	17,6	17,6	17,8	17,2	17,1	17,5	17,1	17,6
11	17,2	16,9	17,8	17,5	16,6	17,8	17,1	17,8	17,9
15	17,1	16,8	16,8	17,3	17,9	18,5	17,5	18,2	18,7
17	17,7	17,1	18,4	17,9	18,4	18,4	17,3	18,3	18,3
19	17,8	17,5	18,6	18,4	19,2	18,7	18,1	18,5	18,7
21	18,2	19,1	19,3	18,2	18,3	19,2	18,4	18,4	19
23	18,1	18,7	19,2	19,2	19,9	20,4	20,4	20,1	20,2
25	18,3	20,4	20,1	18,9	18,7	18,5	18,4	18,8	18,5
28	18,4	19,1	19,4	18,5	18,4	19,1	18,5	19,2	19,2
30	19,5	19,3	19,0	19,1	19,5	19,6	19,1	19,4	19,5
32	20,6	20,1	20,1	22,3	22,1	23,1	22,5	22	22,4
35	21,2	22,3	22,3	22,5	22,4	22,1	22,8	21,8	22,6
38	20,8	22,4	22,4	25,1	23,1	24,1	23,6	23,2	23,6
40	22,1	22,3	23,5	25,6	23,2	24,6	24,6	24,8	24,1
42	22,8	22,4	23,6	24,2	23,4	25,4	24,6	24,6	24,5
44	22,4	21,3	22,4	23,2	23,2	22,5	24,8	25,2	25,3
47	23,2	23,2	23,6	22,5	23,5	24,5	26,2	26,2	26,1
49	23,5	22,6	23,5	25,6	24,1	23,5	26,5	25,8	25,3
51	25,4	25	24,6	22,6	23,1	25,6	25,4	25,4	25,2
53	22,1	25,6	23,4	25,1	24,6	26,1	24,3	25,3	25,6
55	23,8	25,2	23,2	26,2	25,3	27	24,6	23,8	24,1
57	23,2	24,3	23,6	22,6	22,3	21,3	25,8	24,6	23,8
60	23,4	24,2	23,6	23,4	23,5	24,5	26,2	25,2	25,1

Realizado por: MIRANDA, J. 2014

Anexo M: REGISTRO DE HUMEDAD DURANTE EL PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN

	T1U1	T1U2	T1U3	T2U1	T2U2	T2U3	T3U1	T3U2	T3U3
1	55,4	55,2	55,2	56,1	55,8	56,4	52,5	54,3	55,2
3	56,2	55,8	54,1	55,5	55,2	55,2	55,3	52,1	55,1
5	55,3	55	55,1	54,2	55,1	55,3	54,2	55,3	54,2
7	55,4	55,2	55,4	55,3	55,5	54,1	55,2	55,2	55,1
9	55,2	55,6	54,3	55,8	55,2	55,2	55,1	55,6	56,7
11	55,7	55,1	55,2	56,1	54,8	55,4	55,7	54,1	56,1
15	55	55,7	54,8	55,2	55,3	55,8	56,1	55,2	55,3
17	55,1	55,2	55,2	55,3	56,1	55,4	54,3	55,6	55,1
19	56,2	55,2	55,3	55,4	55,2	56,1	53,2	55,8	57,2
21	55,4	55,1	55,4	55,1	54,1	57,2	55,6	55,4	55,2
23	55,3	54,9	55,2	54,3	55,2	55,2	55,2	54,8	54,9
25	55,2	55,3	55,7	53,1	55,1	55,1	55,1	54,9	56,1
28	55,4	55,4	56,1	52,4	55,2	55,3	57,2	55,2	54,3
30	54,3	54,5	55,2	55,2	55,8	55,4	55,3	53,2	54,1
32	54,3	55,4	56,1	55,4	55,2	55,8	56,1	53,2	54,1
35	55,2	54,3	55,2	56,1	55,8	55,2	55,2	55,4	54,2
38	54,6	55,6	55,6	55,5	55,6	55,1	54,3	55,2	55,6
40	55,4	55,2	55,4	55,4	55,4	55,4	55,4	55,6	56,1
42	54,2	55,8	55,2	54,2	54,8	55,3	55,2	55,4	55,8
44	51,1	55,5	55,3	55,4	54,2	55,2	55,1	55,8	55,6
47	54,6	54,7	55,6	55,6	53,5	55,1	55,6	55,4	55,2
49	54,2	50,2	54,1	55,8	54,6	55,6	55,5	53,8	55,1
51	54,3	55,6	54,2	55,9	55,2	55,7	55,3	54,1	55,3
53	54,5	55,1	55,1	55,4	55,8	55,2	55,2	55,6	55,2
55	54,8	55,4	54,1	55,6	55,2	55,1	55,1	55,2	55,4
57	55,2	55,2	55,6	55,2	55,1	55,6	54,3	55,4	55,3
60	55,1	54,3	55,2	55,4	55,6	55,2	52,1	55,2	55,2

Realizado por: MIRANDA, J. 2014

Anexo N: RESULTADOS DE LA PRUEBA DE IDENTIFICACIÓN

Microgen ID					
Microgen GNA					
Specimen Details					
Lab Ref.: LABCESTTA			Date: 23/06/2014		
Name: SCI					
Specimen Type:					
Source (ward/location):					
Results Entry					
Octal Code: 0620					
- LYS Lysine Decarboxylase	- ORN Ornithine Decarboxylase	- H2S H2S Production			
+ GLU Acid from Glucose	+ MAN Acid from Mannitol	- XYL Acid from Xylose			
- ONP ONPG	+ IND Indole	- UR Urea Hydrolysis			
- VP Voges Proskauer	- CIT Citrate Utilization	- TDA Tryptophan Deaminase			
Identification Analysis					
	<i>Shigella Serogroups A,B&C</i>	<i>E.coli-inactive</i>	<i>P.stuartii</i>	<i>E.agglomerans</i>	<i>C.freundii</i>
<i>Select ID Choice</i>	Yes	No	No	No	No
<i>Probability</i>	1/2	1/18	1/5.001	1/7.478	1/9.296
<i>Percent Probability</i>	88,4%	11,48%	0,04%	0,03%	0,02%
<i>Likelihood</i>	100%	42,86%	0,04%	0,09%	0,06%
<i>Human Isolate</i>	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Tests against</i>					
<i>Test 1</i>			TDA (95%)	XYL (93%)	XYL (89%)
<i>Test 2</i>			CIT (93%)	ONP (90%)	ONP (89%)
<i>Test 3</i>			MAN (10%)	IND (20%)	H2S (78%)
<i>Additional Tests</i>	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Motility (37C)</i>	0,1%	5%	85%	85%	89%
<i>Acid from Inositol</i>	0,1%	1%	95%	15%	0,1%
<i>Acid from Rhamnose</i>	5%	65%	0,1%	85%	99,9%
<i>Malonate Utilization</i>	0,1%	0,1%	0,1%	65%	11%
<i>Acid from Lactose</i>	0,1%	25%	2%	40%	78%
<i>Additional Comments</i>	8	7			
7	Previously the Alkalscens Dispar (ADO) Group				
8	Shigella species cannot be identified using biochemistry alone, perform serology to confirm the species type				
Identification Comments					
Very Good Identification of Shigella Serogroups A,B&C					
The strain is very typical and is moderately well separated from other suggested identification choices					

Fuente: LAB-CESTTA

Microgen ID

Microgen GNA+ B Oxidase Negative

Specimen Details

Lab Ref.: LABCESTTA
 Name: SC4
 Specimen Type:
 Source (ward/location):

Date: 23/06/2014

Results Entry

Octal Code: 00250000

- LYS	Lysine Decarboxylase	- ORN	Ornithine Decarboxylase	- H2S	H2S Production
- GLU	Acid from Glucose	- MAN	Acid from Mannitol	- XYL	Acid from Xylose
- ONP	ONPG	+ IND	Indole	- UR	Urea Hydrolysis
+ VP	Voges Proskauer	- CIT	Citrate Utilization	+ TDA	Tryptophan Deaminase
- GEL	Gelatin Liquefaction	- MAL	Malonate Utilization	- INO	Acid from Inositol
- SOR	Acid from Sorbitol	- RHA	Acid from Rhamnose	- SUC	Acid from Sucrose
- LAC	Acid from Lactose	- ARA	Acid from Arabinose	- ADO	Acid from Adonitol
- RAF	Acid from Raffinose	- SAL	Acid from Salicin	- ARG	Arginine Dihydrolase

Identification Analysis

	<i>P.rustigianii</i>	<i>X.nematophilis</i> (25°C)	<i>M.morganii</i> ssp. <i>morganii</i>	<i>P.stuartii</i>	<i>A.lwoffii</i>
Select ID Choice	Yes	No	No	No	No
Probability	1/1.882.337	1/63.699.459	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000
Percent Probability	96,34%	2,85%	0,28%	0,13%	0,09%
Likelihood	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<0.01%
Human Isolate	Yes	No	Yes	Yes	Yes
Tests against					
Test 1	GLU (99,9%)	VP (0,1%)	GLU (99,9%)	GLU (99,9%)	IND (0,1%)
Test 2	VP (0,1%)	TDA (0,1%)	VP (0,1%)	VP (0,1%)	VP (0,1%)
Test 3		GLU (80%)	ORN (95%)	INO (95%)	TDA (0,1%)
Additional Tests	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
KCN Inhibition	99,9%	0,1%	98%	99,9%	0%
Acid from Trehalose	0,1%	0,1%	0,1%	98%	0%
Motility (37C)	30%	99,9%	95%	85%	0,1%
Gas from D-Glucose	35%	0,1%	90%	0,1%	0%
Tartrate (Jordans)	50%	60%	95%	90%	0%
Additional Comments	43		36		2

- 2 Glucose negative, non haemolytic *Acinetobacter* sp, perform nitrate(-) and motility(-)
 36 Original citation: Int. J. Syst. Bacteriol. (1992) 42 : 613-620
 43 Previously *Providencia alcalifaciens* biogroup 3. J. Clin. Microbiol. (1983) 15 : 1057-1060
 #. Isolate is GLUCOSE NEGATIVE - it is recommended that you check that it is not OXIDASE POSITIVE

Identification Comments

Acceptable Identification of *Providencia rustigianii*
 The strain is not typical (multiple tests are against), although it is highly separated from other suggested identification choices
 ADDITIONAL TESTS MAY IMPROVE THE IDENTIFICATION.
 Isolate is GLUCOSE NEGATIVE - it is recommended that you check that it is not OXIDASE POSITIVE

Microgen ID**Microgen GNA+ B Oxidase Negative****Specimen Details**

Lab Ref: LABCESTTA
 Name: SC7
 Specimen Type:
 Source (ward/location):

Date: 23/06/2014

Results Entry

Octal Code: 70310001

+ LYS	Lysine Decarboxylase	+ ORN	Ornithine Decarboxylase	+ H2S	H2S Production
- GLU	Acid from Glucose	- MAN	Acid from Mannitol	- XYL	Acid from Xylose
- ONP	ONPG	+ IND	Indole	+ UR	Urea Hydrolysis
- VP	Voges Proskauer	- CIT	Citrate Utilization	+ TDA	Tryptophan Deaminase
- GEL	Gelatin Liquefaction	- MAL	Malonate Utilization	- INO	Acid from Inositol
- SOR	Acid from Sorbitol	- RHA	Acid from Rhamnose	- SUC	Acid from Sucrose
- LAC	Acid from Lactose	- ARA	Acid from Arabinose	- ADO	Acid from Adonitol
- RAF	Acid from Raffinose	- SAL	Acid from Salicin	+ ARG	Arginine Dihydrolyase

Identification Analysis

	<i>M.morganii</i> biogp 1	<i>M.morganii</i> ssp.Siboni 1	<i>M.morganii</i> ssp.morganii	<i>M.morganii</i>	<i>E.tarda</i>
Select ID Choice	Yes	No	No	No	No
Probability	1/11.164.168	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000
Percent Probability	92,61%	5,72%	1,47%	0,21%	<0.01%
Likelihood	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<0.01%
Human Isolate	Yes	No	Yes	Yes	Yes
Tests against					
Test 1	GLU (99,9%)	GLU (99,9%)	GLU (99,9%)	H2S (0,1%)	GLU (99,9%)
Test 2	ARG (0,1%)	ARG (0,1%)	ARG (0,1%)	GLU (99,9%)	UR (0,1%)
Test 3	H2S (15%)	H2S (7%)	LYS (1%)	ARG (0,1%)	TDA (0,1%)
Additional Tests	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Acid from Trehalose	0,1%	99,9%	0,1%	10%	0,1%
Motility (37C)	0,1%	79%	95%	95%	98%
Acid from Maltose	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%	99,9%
Additional Comments	36		36	35	
	35	Previously <i>Proteus morganii</i>			
	36	Original citation: Int. J. Syst. Bacteriol. (1992) 42 : 613-620			
	#	Isolate is GLUCOSE NEGATIVE - it is recommended that you check that it is not OXIDASE POSITIVE			

Identification Comments

Acceptable Identification of *Morganella morganii* biogp 1
 The strain is not typical (multiple tests are against), although it is well separated from other suggested identification choices
 ADDITIONAL TESTS MAY IMPROVE THE IDENTIFICATION.
 Isolate is GLUCOSE NEGATIVE - it is recommended that you check that it is not OXIDASE POSITIVE

Microgen ID

Microgen GNA+ B Oxidase Negative

Specimen Details

Lab Ref.: LABCESTTA
 Name: SC8
 Specimen Type:
 Source (ward/location):

Date: 23/06/2014

Results Entry

Octal Code: 00654000

- LYS Lysine Decarboxylase	- ORN Ornithine Decarboxylase	- H2S H2S Production
- GLU Acid from Glucose	- MAN Acid from Mannitol	- XYL Acid from Xylose
+ ONP ONPG	+ IND Indole	- UR Urea Hydrolysis
+ VP Voges Proskauer	- CIT Citrate Utilization	+ TDA Tryptophan Deaminase
+ GEL Gelatin Liquefaction	- MAL Malonate Utilization	- INO Acid from Inositol
- SOR Acid from Sorbitol	- RHA Acid from Rhamnose	- SUC Acid from Sucrose
- LAC Acid from Lactose	- ARA Acid from Arabinose	- ADO Acid from Adonitol
- RAF Acid from Raffinose	- SAL Acid from Salicin	- ARG Arginine Dihydrolase

Identification Analysis

	<i>X.nematophilis</i> (25°C)	<i>Prustigianii</i>	<i>M.morganii</i> ssp. <i>morganii</i>	<i>P.luminescens</i> (25C)	<i>P.stuartii</i>
Select ID Choice	Yes	No	No	No	No
Probability	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000
Percent Probability	98,49%	0,83%	0,27%	0,14%	0,12%
Likelihood	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<0.01%
Human Isolate	No	Yes	Yes	Yes	Yes
Tests against					
Test 1	ONP (0,1%)	GLU (99,9%)	GLU (99,9%)	GLU (99,9%)	GLU (99,9%)
Test 2	VP (0,1%)	ONP (0,1%)	VP (0,1%)	ONP (0,1%)	VP (0,1%)
Test 3	TDA (0,1%)	VP (0,1%)	GEL (0,1%)	VP (0,1%)	GEL (0,1%)
Additional Tests					
KCN Inhibition	0,1%	99,9%	98%	0,1%	99,9%
Acid from Trehalose	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%	98%
DNase (25C)	20%	0,1%	0,1%	0,1%	10%
Motility (37C)	99,9%	30%	95%	99,9%	85%
Acid from Maltose	0,1%	0,1%	0,1%	25%	1%
Additional Comments		43	36	39	
36	Original citation: Int. J. Syst. Bacteriol. (1992) 42 : 613-620				
39	Previously <i>Xenorhabdus luminescens</i> . Int. J. Syst. Bacteriol. (1993) 43 : 249-255				
43	Previously <i>Providencia alcalifaciens</i> biogroup 3. J. Clin. Microbiol. (1983) 15 : 1057-1060				
#.	Isolate is GLUCOSE NEGATIVE - it is recommended that you check that it is not OXIDASE POSITIVE				

Identification Comments

Acceptable Identification of *Xenorhabdus nematophilis* (25°C)
 The strain is not typical (multiple tests are against), although it is highly separated from other suggested identification choices
 ADDITIONAL TESTS MAY IMPROVE THE IDENTIFICATION.
 Isolate is GLUCOSE NEGATIVE - it is recommended that you check that it is not OXIDASE POSITIVE

Microgen GNA+ B Oxidase Negative

Specimen Details

Lab Ref.: LABCESTTA

Date: 23/06/2014

Name: SC10

Specimen Type:

Source (ward/location):

Results Entry

Octal Code: 06255776

- LYS Lysine Decarboxylase	- ORN Ornithine Decarboxylase	- H2S H2S Production
+ GLU Acid from Glucose	+ MAN Acid from Mannitol	- XYL Acid from Xylose
- ONP ONPG	+ IND Indole	- UR Urea Hydrolysis
+ VP Voges Proskauer	- CIT Citrate Utilization	+ TDA Tryptophan Deaminase
+ GEL Gelatin Liquefaction	- MAL Malonate Utilization	+ INO Acid from Inositol
+ SOR Acid from Sorbitol	+ RHA Acid from Rhamnose	+ SUC Acid from Sucrose
+ LAC Acid from Lactose	+ ARA Acid from Arabinose	+ ADO Acid from Adonitol
+ RAF Acid from Raffinose	+ SAL Acid from Salicin	- ARG Arginine Dihydrolase

Identification Analysis

	<i>E.agglomerans</i> complex	<i>S.plymuthica</i>	<i>S.liquefaciens</i>	<i>K.ozonae</i>	<i>S.dorifera</i> biogp 2
Select ID Choice	Yes	No	No	No	No
Probability	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000
Percent Probability	100%	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<0.01%
Likelihood	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<0.01%
Human Isolate	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Tests against					
Test 1	GEL (2%)	IND (0,1%)	XYL (99,9%)	IND (0,1%)	XYL (99,9%)
Test 2	XYL (93%)	TDA (0,1%)	TDA (0,1%)	VP (0,1%)	ONP (99,9%)
Test 3	ADO (7%)	RHA (0,1%)	IND (1%)	TDA (0,1%)	TDA (0,1%)
Additional Tests	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
DNase (25C)	0,1%	99,9%	85%	0,1%	99,9%
Acid from Cellobiose	55%	88%	5%	92%	99,9%
Motility (37C)	85%	50%	95%	0,1%	99,9%
Esculin Hydrolysis	60%	81%	97%	80%	40%
Gas from D-Glucose	20%	40%	75%	50%	13%
Additional Comments			47		

47 Previously *Enterobacter liquefaciens*. Int. J. Syst. Bacteriol. (1973) 23 : 217-225

Identification Comments

Acceptable Identification of *Enterobacter agglomerans* complex
 The strain is not typical (multiple tests are against), although it is highly separated from other suggested identification choices
 ADDITIONAL TESTS MAY IMPROVE THE IDENTIFICATION.

Microgen ID

Microgen GNA+ B Oxidase Negative

Specimen Details

Lab Ref.: LABCESTTA
 Name: SC13
 Specimen Type:
 Source (ward/location):

Date: 23/06/2014

Results Entry

Octal Code: 06200000

- LYS	Lysine Decarboxylase	- ORN	Ornithine Decarboxylase	- H2S	H2S Production
+ GLU	Acid from Glucose	+ MAN	Acid from Mannitol	- XYL	Acid from Xylose
- ONP	ONPG	+ IND	Indole	- UR	Urea Hydrolysis
- VP	Voges Proskauer	- CIT	Citrate Utilization	- TDA	Tryptophan Deaminase
- GEL	Gelatin Liquefaction	- MAL	Malonate Utilization	- INO	Acid from Inositol
- SOR	Acid from Sorbitol	- RHA	Acid from Rhamnose	- SUC	Acid from Sucrose
- LAC	Acid from Lactose	- ARA	Acid from Arabinose	- ADO	Acid from Adonitol
- RAF	Acid from Raffinose	- SAL	Acid from Salicin	- ARG	Arginine Dihydrolase

Identification Analysis

	<i>Shigella</i> Serogroups A,B&C	<i>E.coli</i> -Inactive	<i>P.luminescens</i> (25C)	<i>X.nematophilis</i> (25°C)	<i>Y.aldovae</i>
Select ID Choice	Yes	No	No	No	No
Probability	1/18	1/2.948	1/10.871	1/15.941	1/68.911
Percent Probability	99,08%	0,61%	0,17%	0,11%	0,03%
Likelihood	66,67%	1,36%	0,1%	0,02%	0,03%
Human Isolate	Yes	Yes	Yes	No	Yes
<i>Tests against</i>					
Test 1		ARA (85%)	MAN (0,1%)	MAN (0,1%)	IND (0,1%)
Test 2				GEL (80%)	
Test 3					
Additional Tests	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Motility (37C)	0,1%	5%	99,9%	99,9%	0,1%
Acid from Maltose	30%	80%	25%	0,1%	0,1%
DNase (25C)	0,1%	0,1%	0,1%	20%	0,1%
Acid from Melibiose	50%	40%	0,1%	0,1%	0,1%
Acid from Dulcitol	2%	40%	0,1%	0,1%	0,1%
Additional Comments	25	21	39		59

- 21 Previously the Alkalscens Dispar (ADO) Group
- 25 *Shigella* species cannot be identified using biochemistry alone, perform serology to confirm the species type
- 39 Previously *Xenorhabdus luminescens*. Int. J. Syst. Bacteriol. (1993) 43 : 249-255
- 59 Previously *Yersinia enterocolitica*-like group X2. Int. J. Syst. Microbiol. (1984) 34 : 166-172

Identification Comments

Very Good Identification of *Shigella* Serogroups A,B&C
 The strain is probably typical and is highly separated from other suggested identification choices

Microgen ID

Microgen GNA+ B Oxidase Negative

Specimen Details

Lab Ref.: LABCESTTA
 Name: SC14
 Specimen Type:
 Source (ward/location):

Date: 23/06/2014

Results Entry

Octal Code: 00204000

- LYS Lysine Decarboxylase	- ORN Ornithine Decarboxylase	- H2S H2S Production
- GLU Acid from Glucose	- MAN Acid from Mannitol	- XYL Acid from Xylose
- ONP ONPG	+ IND Indole	- UR Urea Hydrolysis
- VP Voges Proskauer	- CIT Citrate Utilization	- TDA Tryptophan Deaminase
+ GEL Gelatin Liquefaction	- MAL Malonate Utilization	- INO Acid from Inositol
- SOR Acid from Sorbitol	- RHA Acid from Rhannose	- SUC Acid from Sucrose
- LAC Acid from Lactose	- ARA Acid from Arabinose	- ADO Acid from Adonitol
- RAF Acid from Raffinose	- SAL Acid from Salicin	- ARG Arginine Dihydrolase

Identification Analysis

	<i>X.nematophilis</i> (25°C)	<i>P.luminescens</i> (25C)	<i>A.lwoffii</i>	<i>A.haemolyticus</i>	<i>P.asymbiotica</i>
Select ID Choice	Yes	No	No	No	No
Probability	1/16	1/10.871	1/1.979.897	1/2.045.168	1/3.981.216
Percent Probability	99,85%	0,15%	<0.01%	<0.01%	<0.01%
Likelihood	16,67%	0,1%	<0.01%	<0.01%	<0.01%
Human Isolate	No	Yes	Yes	Yes	Yes
Tests against					
Test 1	GLU (80%)	GLU (99,9%)	IND (0,1%)	IND (0,1%)	GLU (99,9%)
Test 2			GEL (0,1%)	GEL (0,1%)	IND (0,1%)
Test 3					
Additional Tests	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Motility (37C)	99,9%	99,9%	0,1%	0,1%	99,9%
Acid from Mannose	80%	25%	0%	0%	0,1%
Acid from Maltose	0,1%	25%	0%	0%	0,1%
DNase (25C)	20%	0,1%	0%	0%	0,1%
Acetate Utilization	0,1%	0,1%	0%	0%	20%
Additional Comments		39	2	3	40

- 2 Glucose negative, non haemolytic *Acinetobacter* sp, perform nitrate(-) and motility(-)
- 3 Glucose negative, haemolytic *Acinetobacter* sp, perform nitrate(-) and motility(-)
- 39 Previously *Xenorhabdus luminescens*. Int. J. Syst. Bacteriol. (1993) 43 : 249-255
- 40 Previously *Xenorhabdus* DNA Group 5.
- #. Isolate is GLUCOSE NEGATIVE - it is recommended that you check that it is not OXIDASE POSITIVE

Identification Comments

Acceptable Identification of *Xenorhabdus nematophilis* (25°C)
 The strain is not typical (one or more tests may be against), but is well separated from other suggested identification choices
 Isolate is GLUCOSE NEGATIVE - it is recommended that you check that it is not OXIDASE POSITIVE

Microgen ID**Microgen GNA+ B Oxidase Negative****Specimen Details**

Lab Ref.: LABCESTTA
 Name: SC16
 Specimen Type:
 Source (ward/location):

Date: 23/06/2014

Results Entry

Octal Code: 00200000

- LYS	Lysine Decarboxylase	- ORN	Ornithine Decarboxylase	- H2S	H2S Production
- GLU	Acid from Glucose	- MAN	Acid from Mannitol	- XYL	Acid from Xylose
- ONP	ONPG	+ IND	Indole	- UR	Urea Hydrolysis
- VP	Voges Proskauer	- CIT	Citrate Utilization	- TDA	Tryptophan Deaminase
- GEL	Gelatin Liquefaction	- MAL	Malonate Utilization	- INO	Acid from Inositol
- SOR	Acid from Sorbitol	- RHA	Acid from Rhamnose	- SUC	Acid from Sucrose
- LAC	Acid from Lactose	- ARA	Acid from Arabinose	- ADO	Acid from Adonitol
- RAF	Acid from Raffinose	- SAL	Acid from Salicin	- ARG	Arginine Dihydrolase

Identification Analysis

	<i>X.nematophilis</i> (25°C)	<i>A.hwoffii</i>	<i>A.haemolyticus</i>	<i>P.luminescens</i> (25C)	<i>Shigella</i> Serogroups A,B&C
Select ID Choice	Yes	No	No	No	No
Probability	1/64	1/1.982	1/2.047	1/10.871	1/240.945
Percent Probability	93,5%	3,01%	2,91%	0,55%	0,02%
Likelihood	4,17%	0,1%	0,1%	0,1%	<0.01%
Human Isolate	No	Yes	Yes	Yes	Yes
Tests against					
Test 1	GLU (80%)	IND (0,1%)	IND (0,1%)	GLU (99,9%)	GLU (99,9%)
Test 2	GEL (80%)				MAN (93%)
Test 3					
Additional Tests	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Motility (37C)	99,9%	0,1%	0,1%	99,9%	0,1%
Acid from Trehalose	0,1%	0%	0%	0,1%	80%
DNase (25C)	20%	0%	0%	0,1%	0,1%
Acid from Maltose	0,1%	0%	0%	25%	30%
Acid from Mannose	80%	0%	0%	25%	99,9%
Additional Comments		2	3	39	25
		2 Glucose negative, non haemolytic <i>Acinetobacter</i> sp, perform nitrate(-) and motility(-)			
		3 Glucose negative, haemolytic <i>Acinetobacter</i> sp, perform nitrate(-) and motility(-)			
		25 <i>Shigella</i> species cannot be identified using biochemistry alone, perform serology to confirm the species type			
		39 Previously <i>Xenorhabdus luminescens</i> . Int. J. Syst. Bacteriol. (1993) 43 : 249-255			
		#. Isolate is GLUCOSE NEGATIVE - it is recommended that you check that it is not OXIDASE POSITIVE			

Identification CommentsAcceptable Identification of *Xenorhabdus nematophilis* (25°C)

The strain is not typical (one or more tests may be against), although it is well separated from other suggested identification choices

Isolate is GLUCOSE NEGATIVE - it is recommended that you check that it is not OXIDASE POSITIVE

Microgen GNA+ B Oxidase Negative

Specimen Details

Lab Ref.: LABCESTTA
 Name: AC18
 Specimen Type:
 Source (ward/location):

Date: 23/06/2014

Results Entry

Octal Code: 10654002

- | | | |
|----------------------------|-------------------------------|----------------------------|
| - LYS Lysine Decarboxylase | - ORN Ornithine Decarboxylase | + H2S H2S Production |
| - GLU Acid from Glucose | - MAN Acid from Mannitol | - XYL Acid from Xylose |
| + ONP ONPG | + IND Indole | - UR Urea Hydrolysis |
| + VP Voges Proskauer | - CIT Citrate Utilization | + TDA Tryptophan Deaminase |
| + GEL Gelatin Liquefaction | - MAL Malonate Utilization | - INO Acid from Inositol |
| - SOR Acid from Sorbitol | - RHA Acid from Rhamnose | - SUC Acid from Sucrose |
| - LAC Acid from Lactose | - ARA Acid from Arabinose | - ADO Acid from Adonitol |
| - RAF Acid from Raffinose | + SAL Acid from Salicin | - ARG Arginine Dihydrolase |

Identification Analysis

	<i>P.vulgaris</i>	<i>X.nematophilis (25°C)</i>	<i>M.morganii ssp.morganii</i>	<i>P.fontium</i>	<i>P.mirabilis</i>
Select ID Choice	Yes	No	No	No	No
Probability	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000
Percent Probability	99,94%	0,03%	0,02%	<0.01%	<0.01%
Likelihood	<0,01%	<0,01%	<0,01%	<0,01%	<0,01%
Human Isolate	Yes	No	Yes	No	Yes
Tests against					
Test 1	GLU (99,9%)	H2S (0,1%)	GLU (99,9%)	GLU (99,9%)	GLU (99,9%)
Test 2	VP (0,1%)	ONP (0,1%)	VP (0,1%)	ONP (0,1%)	ONP (0,1%)
Test 3	ONP (1%)	VP (0,1%)	GEL (0,1%)	IND (0,1%)	SAL (0,1%)
Additional Tests					
	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Acid from Mannose	0,1%	80%	98%	0,1%	0,1%
Acid from Maltose	97%	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%
Gas from D-Glucose	85%	0,1%	90%	0,1%	96%
Acid from Trehalose	30%	0,1%	0,1%	0,1%	98%
Additional Comments					
			36	37	
	36 Original citation: Int. J. Syst. Bacteriol. (1992) 42 : 613-620				
	37 Original citation: Int. J. Syst. Bacteriol. (1988) 38 : 183-189				
	#. Isolate is GLUCOSE NEGATIVE - it is recommended that you check that it is not OXIDASE POSITIVE				

Identification Comments

Acceptable Identification of *Proteus vulgaris*
 The strain is not typical (multiple tests are against), although it is highly separated from other suggested identification choices
 ADDITIONAL TESTS MAY IMPROVE THE IDENTIFICATION.
 Isolate is GLUCOSE NEGATIVE - it is recommended that you check that it is not OXIDASE POSITIVE

Anexo Ñ: INFORMES DE RESULTADOS



LABORATORIO DE ANÁLISIS AMBIENTAL E INSPECCIÓN

Panamericana Sur Km. 1 ½
 Telefax: (03) 2998232
 ESPOCH
 FACULTAD DE CIENCIAS
 RIOBAMBA - ECUADOR

INFORME DE ENSAYO No: 1068
ST: 14 - 409 ANÁLISIS DE AGUAS

Nombre Peticionario: CESTTA
Atn. Ing. Marcela Erazo
Dirección: Panamericana Sur km 1,5

FECHA: 10 de Julio del 2014
NUMERO DE MUESTRAS: 1
FECHA Y HORA DE RECEPCIÓN EN LAB: 2014 / 07 / 01 - 09:30
FECHA DE MUESTREO: 2014 / 07 / 01 - 08:30
FECHA DE ANÁLISIS: 2014 / 07/01 - 2014 / 07/ 10
TIPO DE MUESTRA: Efluente
CÓDIGO LABCESTTA: LAB-ATR01-14
CÓDIGO DE LA EMPRESA: AGUA CARACTERIZACIÓN
PUNTO DE MUESTREO: PTAR LABCESTTA
ANÁLISIS SOLICITADO: Físico - Químico
PERSONA QUE TOMA LA MUESTRA: Egd. Jorge Miranda
CONDICIONES AMBIENTALES DE ANÁLISIS: T máx.:25.0 °C. T mín.: 15.0 °C

RESULTADOS ANALÍTICOS:

PARÁMETROS	MÉTODO /NORMA	UNIDAD	RESULTADO	VALOR LÍMITE PERMISIBLE	INCERTIDUMBRE (k=2)
Potencial Hidrógeno	PEE/LABCESTTA/05 Standard Method No. 4500-H ⁺ B	Unidades de pH	8,7	3-9	±,015
*Sólidos Sedimentables	PEE/LABCESTTA/56 Standard Methods No. 2540 F	ml/L	0,5	20	
Mercurio	PEE/LABCESTTA/174 EPA245.7/EPA 3015	mg/L	<0,0001	0,01	-
Arsénico	PEE/LABCESTTA/174 EPA 200.7 / EPA 3015a ICP	mg/L	<0,01	0,1	±22%
Sólidos Totales Disueltos	PEE/LABCESTTA/11 Standard Methods No. 2540 C	mg/L	2674	-	±11%
Aluminio	PEE/LABCESTTA/174 EPA 200.7 / EPA 3015a ICP	mg/L	1,01	5,0	±7%
Níquel	PEE/LABCESTTA/31 Standard Methods No. 3030B, 3111 B	mg/L	<0,2	2,0	±47%
Sólidos Suspendidos	PEE/LABCESTTA/13 Standard Methods No. 2540 D	mg/L	<50	220	±20%
Grasas y Aceites	PEE/LABCESTTA/42 Standard Methods No. 5520 B	mg/L	<2	100	±30%
Demanda Química de Oxígeno	PEE/LABCESTTA/09 Standard Methods No. 5220 D	mg/L	420	500	±3%

Este documento no puede ser reproducido ni total ni parcialmente sin la aprobación escrita del laboratorio.
 Los resultados arriba indicados sólo están relacionados con los objetos ensayados

Página 1 de 1
 Edición 1

MC01-16

Tensoactivos	PEE/LABCESTTA/44 Standard Methods No. 5540 C	mg/L	11	2,0	±15%
Hierro	PEE/LABCESTTA/35 Standard Methods No. 3500-Fe B 3030-E3111-B	mg/L	1,09	25,0	±9%
Demanda Bioquímica de Oxígeno (5días)	PEE/LABCESTTA/46 Standard Methods No. 5210 B	mg/L	190	250	±20%

OBSERVACIONES:

- Muestra receptada en el laboratorio.
- Los parámetros con (*) no están incluidos en el alcance de acreditación del OAE.
- Los parámetros fueron comparados con la tabla 11 del TULSMA Límites de descarga al sistema de alcantarillado.

RESPONSABLES DEL INFORME:

Dr. Mauricio Álvarez
RESPONSABLE TÉCNICO

Ing. Marcela Erazo
JEFE DE LABORATORIO

INFORME DE ENSAYO No: 250
ST: 14-01 ANÁLISIS DE SEDIMENTOS

Nombre Peticionario: CESTTA
Atn. Ing. Marcela Erazo
Dirección: Panamericana sur Km 1 ½.

FECHA: 10 de Julio del 2014
NUMERO DE MUESTRAS: 1
FECHA Y HORA DE RECEPCIÓN EN LAB: 2014/07/01 09:30
FECHA DE MUESTREO: 2014/07/01 08:00
FECHA DE ANÁLISIS: 2014/07/01 - 2014/07/10
TIPO DE MUESTRA: Sedimentos
CÓDIGO LABCESTTA: LAB-STR 01-14
CÓDIGO DE LA EMPRESA: CONTROL 1D
PUNTO DE MUESTREO: RESIDUAL DE SEDIMENTOS
ANÁLISIS SOLICITADO: Físico- Químico y Microbiológico.
PERSONA QUE TOMA LA MUESTRA: Egdo. Jorge Miranda
CONDICIONES AMBIENTALES: T máx.:25.0 °C. T mín.: 15.0 °C
RESULTADOS ANALÍTICOS:

PARÁMETROS	MÉTODO /NORMA	UNIDAD	RESULTADO	INCERTIDUMBRE (k=2)
Potencial de Hidrógeno	PEE/LABCESTTA/24 EPA 9045 D	Unidades de pH	6,54	±0.10%
*Aluminio	PEE/LABCESTTA/197 EPA 3051 a / EPA 200.7 ICP	mg/Kg	13,27	
*Arsénico	PEE/LABCESTTA/197 EPA 3051 a / EPA 200.7 ICP	mg/Kg	10,9	
*Bario	PEE/LABCESTTA/197 EPA 3051 a / EPA 200.7 ICP	mg/Kg	224,32	
*Cadmio	PEE/LABCESTTA/197 EPA 3051 a / EPA 200.7 ICP	mg/Kg	30,06	
*Cromo	PEE/LABCESTTA/197 EPA 3051 a / EPA 200.7 ICP	mg/Kg	1,12	
*Cobre	PEE/LABCESTTA/197 EPA 3051 a / EPA 200.7 ICP	mg/Kg	728,15	
*Mercurio	PEE/LABCESTTA/197 EPA 3051 a / EPA 200.7 ICP	mg/Kg	1,5	
*Niquel	PEE/LABCESTTA/197 EPA 3051 a / EPA 200.7 ICP	mg/Kg	32,81	
*Plomo	PEE/LABCESTTA/197 EPA 3051 a / EPA 200.7 ICP	mg/Kg	134	
*Selenio	PEE/LABCESTTA/197 EPA 3051 a / EPA 200.7 ICP	mg/Kg	52,25	

Este documento no puede ser reproducido ni total ni parcialmente sin la aprobación escrita del laboratorio.
Los resultados arriba indicados sólo están relacionados con los objetos ensayados
MC01-16

Página 1 de 1
Edición 1

TPH	PEE/LABCESTTA/26 TNRCC 1005	mg/Kg	5428,41	±4%
*Humedad	PEE/LABCESTTA/80 ASTM D4959	%	55,4	
*Aerobios	PEE/LABCESTTA/145 APIHA 9215 B	UFC/g	5*10 ⁵	

OBSERVACIONES:

- Muestra receptada en el laboratorio.
- Los ensayos marcados con (*) no están incluidos en el alcance de acreditación del OAE

RESPONSABLES DEL INFORME:

Dr. Mauricio Álvarez
RESPONSABLE TÉCNICO

Ing. Marcela Erazo
JEFE DE LABORATORIO

INFORME DE ENSAYO No:
ST:

270
14-02 ANÁLISIS DE SEDIMENTOS

Nombre Peticionario:
Atn.
Dirección:

CESTTA
Ing. Marcela Erazo
Panamericana sur Km 1 ½.

FECHA:
NUMERO DE MUESTRAS:
FECHA Y HORA DE RECEPCIÓN EN LAB:
FECHA DE MUESTREO:
FECHA DE ANÁLISIS:
TIPO DE MUESTRA:
CÓDIGO LABCESTTA:
CÓDIGO DE LA EMPRESA:
PUNTO DE MUESTREO:
ANÁLISIS SOLICITADO:
PERSONA QUE TOMA LA MUESTRA:
CONDICIONES AMBIENTALES:

10 de Septiembre del 2014
1
2014/08/30 09:30
2014/08/30 09:00
2014/08/30 - 2014/09/10
Sedimentos
LAB-STR 02-14
T1
CESTTA CUBETA
Físico- Químico y Microbiológico.
Egdo. Jorge Miranda
T máx.:25.0 °C. T min.: 15.0 °C

RESULTADOS ANALÍTICOS:

PARÁMETROS	MÉTODO /NORMA	UNIDAD	RESULTADO	INCERTIDUMBRE (k=2)
Potencial de Hidrógeno	PEE/LABCESTTA/24 EPA 9045 D	Unidades de pH	7,05	±0.15%
*Aluminio	PEE/LABCESTTA/197 EPA 3051 a / EPA 200.7 ICP	mg/Kg	9391,03	
*Arsénico	PEE/LABCESTTA/197 EPA 3051 a / EPA 200.7 ICP	mg/Kg	8,47	
*Bario	PEE/LABCESTTA/197 EPA 3051 a / EPA 200.7 ICP	mg/Kg	180,64	
*Cadmio	PEE/LABCESTTA/197 EPA 3051 a / EPA 200.7 ICP	mg/Kg	15,18	
*Cromo	PEE/LABCESTTA/197 EPA 3051 a / EPA 200.7 ICP	mg/Kg	0,85	
*Cobre	PEE/LABCESTTA/197 EPA 3051 a / EPA 200.7 ICP	mg/Kg	526,36	
*Mercurio	PEE/LABCESTTA/197 EPA 3051 a / EPA 200.7 ICP	mg/Kg	1,14	
*Níquel	PEE/LABCESTTA/197 EPA 3051 a / EPA 200.7 ICP	mg/Kg	20,93	
*Plomo	PEE/LABCESTTA/197 EPA 3051 a / EPA 200.7 ICP	mg/Kg	98,65	
*Selenio	PEE/LABCESTTA/197 EPA 3051 a / EPA	mg/Kg	26,83	

Este documento no puede ser reproducido ni total ni parcialmente sin la aprobación escrita del laboratorio.
Los resultados arriba indicados sólo están relacionados con los objetos ensayados

Página 1 de 1
Edición 1

MC01-16

	200.7 ICP			
TPH	PEE/LABCESTTA/26 TNRCC 1005	mg/Kg	226,30	±26%
*Humedad	PEE/LABCESTTA/80 ASTM D4959	%	54,87	
*Aerobios	PEE/LABCESTTA/145 APHA 9215 B	UFC/g	1,1*10 ⁶	

OBSERVACIONES:

- Muestra receptada en el laboratorio.
- Los ensayos marcados con (*) no están incluidos en el alcance de acreditación del OAE

RESPONSABLES DEL INFORME:

Dr. Mauricio Álvarez
RESPONSABLE TÉCNICO

Ing. Marcela Erazo
JEFE DE LABORATORIO

INFORME DE ENSAYO No: 270
ST: 14-02 ANÁLISIS DE SEDIMENTOS

Nombre Peticionario: CESTTA
Atn: Ing. Marcela Erazo
Dirección: Panamericana sur Km 1 ½.

FECHA: 10 de Septiembre del 2014
NUMERO DE MUESTRAS: 1
FECHA Y HORA DE RECEPCIÓN EN LAB: 2014/08/30 09:30
FECHA DE MUESTREO: 2014/08/30 09:10
FECHA DE ANÁLISIS: 2014/08/30 - 2014/09/10
TIPO DE MUESTRA: Sedimentos
CÓDIGO LABCESTTA: LAB-STR 03-14
CÓDIGO DE LA EMPRESA: T2
PUNTO DE MUESTREO: CESTTA CUBETA
ANÁLISIS SOLICITADO: Físico- Químico y Microbiológico.
PERSONA QUE TOMA LA MUESTRA: Egdo. Jorge Miranda
CONDICIONES AMBIENTALES: T máx.:25.0 °C. T mín.: 15.0 °C
RESULTADOS ANALÍTICOS:

PARÁMETROS	MÉTODO /NORMA	UNIDAD	RESULTADO	INCERTIDUMBRE (k=2)
Potencial de Hidrógeno	PEE/LABCESTTA/24 EPA 9045 D	Unidades de pH	7,25	+0,13%
*Aluminio	PEE/LABCESTTA/197 EPA 3051 a / EPA 200.7 ICP	mg/Kg	9066,33	
*Arsénico	PEE/LABCESTTA/197 EPA 3051 a / EPA 200.7 ICP	mg/Kg	8,36	
*Bario	PEE/LABCESTTA/197 EPA 3051 a / EPA 200.7 ICP	mg/Kg	182,81	
*Cadmio	PEE/LABCESTTA/197 EPA 3051 a / EPA 200.7 ICP	mg/Kg	15,36	
*Cromo	PEE/LABCESTTA/197 EPA 3051 a / EPA 200.7 ICP	mg/Kg	0,87	
*Cobre	PEE/LABCESTTA/197 EPA 3051 a / EPA 200.7 ICP	mg/Kg	533,64	
*Mercurio	PEE/LABCESTTA/197 EPA 3051 a / EPA 200.7 ICP	mg/Kg	1,20	
*Níquel	PEE/LABCESTTA/197 EPA 3051 a / EPA 200.7 ICP	mg/Kg	21,07	
*Plomo	PEE/LABCESTTA/197 EPA 3051 a / EPA 200.7 ICP	mg/Kg	99,53	
*Selenio	PEE/LABCESTTA/197 EPA 3051 a / EPA 200.7 ICP	mg/Kg	27,31	

Este documento no puede ser reproducido ni total ni parcialmente sin la aprobación escrita del laboratorio.
Los resultados arriba indicados sólo están relacionados con los objetos ensayados

MC01-16

Página 1 de 1
Edición 1



LABCESTTA
Tecnología & Soluciones

SGC

LABORATORIO DE ANÁLISIS AMBIENTAL E INSPECCIÓN

Panamericana Sur Km. 1 ½
Telefax: (03) 2998232
ESPOCH
FACULTAD DE CIENCIAS
RIOBAMBA - ECUADOR

TPH	PEE/LABCESTTA/26 TNRCC 1005	mg/Kg	234,49	±26%
*Humedad	PEE/LABCESTTA/80 ASTM D4959	%	55,4	
*Acrobios	PEE/LABCESTTA/145 APHA 9215 B	UFC/g	1,97*10 ⁶	

OBSERVACIONES:

- Muestra receptada en el laboratorio.
- Los ensayos marcados con (*) no están incluidos en el alcance de acreditación del OAE

RESPONSABLES DEL INFORME:

Dr. Mauricio Álvarez
RESPONSABLE TÉCNICO

Ing. Marcela Erazo
JEFE DE LABORATORIO

INFORME DE ENSAYO No:
ST:

270
14-02 ANÁLISIS DE SEDIMENTOS

Nombre Peticionario:
Atn.
Dirección:

CESTTA
Ing. Marcela Erazo
Panamericana sur Km 1 ½.

FECHA:
NUMERO DE MUESTRAS:
FECHA Y HORA DE RECEPCIÓN EN LAB:
FECHA DE MUESTREO:
FECHA DE ANÁLISIS:
TIPO DE MUESTRA:
CÓDIGO LABCESTTA:
CÓDIGO DE LA EMPRESA:
PUNTO DE MUESTREO:
ANÁLISIS SOLICITADO:
PERSONA QUE TOMA LA MUESTRA:
CONDICIONES AMBIENTALES:
RESULTADOS ANALÍTICOS:

10 de Septiembre del 2014
1
2014/08/30 09:30
2014/08/30 09:20
2014/08/30 - 2014/09/10
Sedimentos
LAB-STR 04-14
T3
CESTTA CUBETA
Físico- Químico y Microbiológico.
Egdo. Jorge Miranda
T máx.:25,0 °C. T mín.: 15,0 °C

PARÁMETROS	MÉTODO /NORMA	UNIDAD	RESULTADO	INCERTIDUMBRE (t=2)
Potencial de Hidrógeno	PEE/LABCESTTA/24 EPA 9045 D	Unidades de pH	7,06	+0,13%
*Aluminio	PEE/LABCESTTA/197 EPA 3051 a / EPA 200.7 ICP	mg/Kg	7338,69	
*Arsénico	PEE/LABCESTTA/197 EPA 3051 a / EPA 200.7 ICP	mg/Kg	6,34	
*Bario	PEE/LABCESTTA/197 EPA 3051 a / EPA 200.7 ICP	mg/Kg	143,40	
*Cadmio	PEE/LABCESTTA/197 EPA 3051 a / EPA 200.7 ICP	mg/Kg	10,55	
*Cromo	PEE/LABCESTTA/197 EPA 3051 a / EPA 200.7 ICP	mg/Kg	0,54	
*Cobre	PEE/LABCESTTA/197 EPA 3051 a / EPA 200.7 ICP	mg/Kg	324,13	
*Mercurio	PEE/LABCESTTA/197 EPA 3051 a / EPA 200.7 ICP	mg/Kg	0,98	
*Níquel	PEE/LABCESTTA/197 EPA 3051 a / EPA 200.7 ICP	mg/Kg	16,76	
*Plomo	PEE/LABCESTTA/197 EPA 3051 a / EPA 200.7 ICP	mg/Kg	83,27	
*Selenio	PEE/LABCESTTA/197 EPA 3051 a / EPA 200.7 ICP	mg/Kg	22,50	

Este documento no puede ser reproducido ni total ni parcialmente sin la aprobación escrita del laboratorio.
Los resultados arriba indicados sólo están relacionados con los objetos ensayados
MC01-16

Página 1 de 1
Edición 1

TPH	PEE/LABCESTTA/26 TNRCC 1005	mg/Kg	209,45	±26%
*Humedad	PEE/LABCESTTA/80 ASTM D4959	%	54,17	
*Aerobios	PEE/LABCESTTA/145 APHA 9215 B	UFC/g	8,03*10 ⁶	

OBSERVACIONES:

- Muestra receptada en el laboratorio.
- Los ensayos marcados con (*) no están incluidos en el alcance de acreditación del OAE

RESPONSABLES DEL INFORME:

Dr. Mauricio Álvarez
RESPONSABLE TÉCNICO

Ing. Marcela Erazo
JEFE DE LABORATORIO

INFORME DE ENSAYO No: 250
ST: 14-01 ANÁLISIS DE SEDIMENTOS

Nombre Peticionario: CESTTA
Atn. Ing. Marcela Erazo
Dirección: Panamericana sur Km 1 ½.

FECHA: 10 de Septiembre del 2014
NUMERO DE MUESTRAS: 1
FECHA Y HORA DE RECEPCIÓN EN LAB: 2014/08/30 09:30
FECHA DE MUESTREO: 2014/08/30 09:25
FECHA DE ANÁLISIS: 2014/08/30 - 2014/09/10
TIPO DE MUESTRA: Sedimentos
CÓDIGO LABCESTTA: LAB-STR 05-14
CÓDIGO DE LA EMPRESA: CONTROL 60D
PUNTO DE MUESTREO: CESTTA CUBETA
ANÁLISIS SOLICITADO: Físico- Químico y Microbiológico.
PERSONA QUE TOMA LA MUESTRA: Egdo. Jorge Miranda
CONDICIONES AMBIENTALES: T máx.:25.0 °C. T mín.: 15.0 °C
RESULTADOS ANALÍTICOS:

PARÁMETROS	MÉTODO /NORMA	UNIDAD	RESULTADO	INCERTIDUMBRE (k=2)
Potencial de Hidrógeno	PEE/LABCESTTA/24 EPA 9045 D	Unidades de pH	6,54	+0,10%
*Aluminio	PEE/LABCESTTA/197 EPA 3051 a / EPA 200.7 ICP	mg/Kg	13134,12	
*Arsénico	PEE/LABCESTTA/197 EPA 3051 a / EPA 200.7 ICP	mg/Kg	10,22	
*Bario	PEE/LABCESTTA/197 EPA 3051 a / EPA 200.7 ICP	mg/Kg	222,96	
*Cadmio	PEE/LABCESTTA/197 EPA 3051 a / EPA 200.7 ICP	mg/Kg	29,9	
*Cromo	PEE/LABCESTTA/197 EPA 3051 a / EPA 200.7 ICP	mg/Kg	1,02	
*Cobrc	PEE/LABCESTTA/197 EPA 3051 a / EPA 200.7 ICP	mg/Kg	726,02	
*Mercurio	PEE/LABCESTTA/197 EPA 3051 a / EPA 200.7 ICP	mg/Kg	1,38	
*Níquel	PEE/LABCESTTA/197 EPA 3051 a / EPA 200.7 ICP	mg/Kg	31,99	
*Plomo	PEE/LABCESTTA/197 EPA 3051 a / EPA 200.7 ICP	mg/Kg	132,22	
*Selenio	PEE/LABCESTTA/197 EPA 3051 a / EPA 200.7 ICP	mg/Kg	51,85	

Este documento no puede ser reproducido ni total ni parcialmente sin la aprobación escrita del laboratorio.
Los resultados arriba indicados sólo están relacionados con los objetos ensayados
MC01-16

Página 1 de 1
Edición 1

TPH	PEE/LABCESTTA/26 TNRCC 1005	mg/Kg	5386,18	±4%
*Humedad	PEE/LABCESTTA/80 ASTM D4959	%	55,1	
*Acrobios	PEE/LABCESTTA/145 APHA 9215 B	UFC/g	3*10 ⁴	

OBSERVACIONES:

- Muestra receptada en el laboratorio.
- Los ensayos marcados con (*) no están incluidos en el alcance de acreditación del QAE

RESPONSABLES DEL INFORME:

Dr. Mauricio Álvarez
RESPONSABLE TÉCNICO

Ing. Marcela Erazo
JEFE DE LABORATORIO