

**DISMINUCIÓN DE LA CARGA MICROBIANA DE AGUAS
RESIDUALES DOMÉSTICAS MEDIANTE LA APLICACIÓN DEL
*Bacillus Subtilis***

DEIMER MENA GONZALEZ

**PROYECTO DE PASANTÍA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO
AMBIENTAL**

**FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL
ESCUELA COLOMBIANA DE CARRERAS INDUSTRIALES – ECCI
MAYO DE 2015**

CONTENIDO

3.1 OBJETIVO GENERAL	5
3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	5
5.1. MARCO TEORICO	7
5.1.1. Descripción general de <i>B. Subtilis</i> :	7
5.1.2. Estructura celular y metabolismo	7
5.1.4. Ecología de <i>B. Subtilis</i>	8
5.1.5. Patologías de <i>B. Subtilis</i>	8
5.1.6. Aplicación en la biotecnología e investigaciones actuales acerca de <i>B. Subtilis</i>	8
5.2. MARCO CONCEPTUAL – TÉRMINOS RELEVANTES	10
5.2.1. Metabolismo	10
5.2.2. Mureína o peptidoglucano	11
5.2.3. Endosporas	11
5.2.4. Bioremediación	11
5.2.5. Subtilin	12
5.4. PARAMETROS MICROBIOLÓGICOS ASOCIADOS A LA CALIDAD DEL AGUA	12
5.4.1. Coliformes totales	12
5.4.2. <i>E. Coli</i>	13
5.5. PARAMETROS FISICOQUIMICOS ASOCIADOS AL AGUA	14
5.5.1. Conductividad	14
5.5.2. Potencial de hidrogeniones	15
5.5.3. Agua residual doméstica (ARD)	16
6.1. MATRIZ LEGAL AMBIENTAL	16
6.1.1. Marco geográfico	17

9.1 Sistema de Tratamiento Primario	21
9.1.2 Bioremediación de aguas residuales domésticas mediante la aplicación del <i>Bacillus Subtilis</i>	22
9.1.3. Parámetros evaluados	24
9.1.4. Medición de parámetros in situ	25
9.1.5. Medición volumétrica Manual: caudal de entrada al sistema	26
9.1.8. Olores	27
10.1. REDUCCION Y/O ELIMINACIÓN DE OLORES	28
11.1. AGUA RESIDUAL DOMÉSTICA	29

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO I: Reporte de resultados microbiológicos y fisicoquímicos.

ANEXO II: Manual de Procedimiento, muestreo de agua.

ANEXO III: Ficha Técnica Subtilin, Biocontrol.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tendencia poblacional de Coliformes totales (LN) para los diferentes tratamientos (dosificaciones de Subtilin) con dos controles negativos, sin adición del producto.	30
Figura 2. Tendencia poblacional de E coli (LN) para los diferentes tratamientos (dosificaciones de Subtilin) con dos controles negativos, sin adición del producto.	32
Figura 3. Tendencia poblacional de Mohos (LN) para los diferentes tratamientos (dosificaciones de Subtilin) con dos controles negativos, sin adición del producto.	33
Figura 4. Tendencia poblacional de levaduras (LN) para los diferentes tratamientos (dosificaciones de Subtilin) con dos controles negativos, sin adición del producto.	34
Figura 5. Tendencia poblacional de Mesofilos (LN) para los diferentes tratamientos (dosificaciones de Subtilin) con dos controles negativos, sin adición del producto.	35

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Comparación del promedio de la densidad de Coliformes fecales en heces animales. ..	13
Tabla 2. Relación mineralización - conductividad.....	15
Tabla 3. Etapas en el desarrollo del proyecto de investigación.....	18
Tabla 4. Parámetros evaluados.....	24
Tabla 5. Primera prueba del 19 al 27 de junio de 2014 Y Segunda prueba del 09 al 15 de agosto de 2014.....	28
Tabla 6. Escala de intensidades para la evaluación del tono hedónico	28
Tabla 7. Frecuencia de evaluadores de toma de muestra primera prueba.....	29
Tabla 8. Comparación de los recuentos microbiológicos para Coliformes totales.	29
Tabla 9. Comparación del recuento de Coliformes totales, valores expresados LN.....	30
Tabla 10. Comparación de los recuentos microbiológicos para E coli	31
Tabla 11. Comparación del recuento de E coli, valores expresados LN.....	31
Tabla 12. Comparación de los recuentos microbiológicos para Mohos.....	32
Tabla 13. Comparación del recuento de mohos, valores expresados LN.....	32
Tabla 14. Comparación de los recuentos microbiológicos par Levaduras.....	33
Tabla 15. Comparación del recuento de levaduras, valores expresados LN.....	33
Tabla 16. Comparación de los recuentos microbiológicos para Mesofilos.....	34
Tabla 17. Comparación del recuento de mesofilos, valores expresados LN.....	35

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Una de las problemáticas ambientales que presentan las plantas de tratamiento de agua residual doméstica y los cuerpos lenticos y lóticos de agua que las reciben es la carga microbiana que contienen. Esta se puede medir a través de la presencia de Coliformes totales, *Escherichia coli*, levaduras, mohos y microorganismos mesófilos que en conjunto permiten estimar el impacto ambiental que generará su descarga a mediano y largo plazo. Entre las principales consecuencias de su descarga no controlada, se encuentran los desequilibrios tróficos y el incremento de riesgos para la salud pública, que a su vez implican un aumento de costos destinados para la recuperación ecosistémica y el control de enfermedades por parte del gobierno y de la comunidad en general.

2. PREGUNTA PROBLEMA

¿Es posible mejorar la calidad microbiológica de aguas residuales domésticas mediante un proceso de biorremediación de tipo aeróbico mediado por *B. Subtilis*?

3. OBJETIVO DE LA INVESTIGACIÓN

3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de *B. Subtilis* como agente biorremediador para disminuir la carga de Coliformes totales, *Escherichia coli*, levadura, mohos, mesófilos así como para reducir los olores ofensivos generados en su almacenamiento.

3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Caracterizar las condiciones fisicoquímicas y microbiológicas del Agua Residual Doméstica (ARD) antes y después del tratamiento con *B. Subtilis*.
- Reducir y/o eliminar los olores ofensivos provenientes de las ARD.
- Controlar el crecimiento y reducir la presencia de Coliformes totales, *Escherichia coli*, levaduras, mohos y mesófilos., a niveles permitidos por las normas internacional EPA Y de igual manera llegar a los limite permisible que denota el decreto número 475 de 1998 – (marzo 10) por las cual se expiden normas técnicas de calidad del agua potable (de igual manera se tiene en cuenta la resolución 631 del 2015 que establece los límites permisibles para vertimiento en Cundinamarca igual manera esta se aplica a nivel nacional).

- Determinar la concentración, dosificación y condiciones de mantenimiento óptimas de *B. Subtilis* para el proceso de disminución de la carga microbiana en ARD.

4. JUSTIFICACIÓN

Desde el compromiso con la protección ambiental y los fundamentos de responsabilidad social que tiene la empresa donde adelanté la pasantía: ANTEK S.A.S, el presente proyecto se basa en el incremento registrado en las últimas décadas de contaminantes vertidos al ambiente que provienen principalmente del desarrollo urbanístico e industrial. El desarrollo urbano ha superado en proporción geométrica a los mecanismos naturales de reciclaje, por lo que las cantidades generadas y dispuestas de residuos superan los procesos de autodepuración de los ecosistemas receptores. Este hecho ha conducido a una evidente acumulación de contaminantes y alteraciones microbiológicas en los distintos ecosistemas hasta llegar a niveles preocupantes (Cardona Gómez Juanita, García Luisa Alejandra, Diciembre 2008).

Por ello, con el fin de reducir en todo lo posible la propagación y aumento de estos agentes contaminantes, hoy en día existe la necesidad de indagar en la búsqueda de procesos que aceleren la degradación de los compuestos orgánicos presentes en los cuerpos de agua, modificando la calidad del agua de los mismos. De esta forma, por medio de esta pasantía se logró probar una estrategia de biorremediación basada en el empleo de la actividad metabólica microbiana de *B. Subtilis* en agua proveniente de una PDTARD de la ciudad de Bogotá.

Esta bacteria ha demostrado tener características óptimas para acelerar proceso de bioremediación y garantizar la reparación de ecosistemas contaminados, gracias a las relaciones de competencia que establece con otros microorganismos patógenos presentes en cuerpos de agua contaminados (IDEA-UNAL, 2008)

5. MARCO DE REFERENCIA

5.1. MARCO TEORICO

5.1.1. Descripción general de *B. Subtilis*:

Originalmente llamado *Subtilis vibrio* en 1935. *B. Subtilis* fue una de las primeras bacterias que se estudiaron como modelo para el desarrollo y la diferenciación celular. Tiene un cromosoma circular cuyo tamaño total es de 4.214.814 pares de bases (4,2 Mbp) (TIGR CMR).

Crece en el intervalo de temperaturas mesófilas. La temperatura óptima es de 25 a 35°Celsius pero soportan hasta los 40°Celsius, con un rango óptimo de potencial de hidrogeniones que oscila entre 6.0 y 9.0 unidades. El estrés y el hambre son comunes en este entorno, por lo tanto, *B. Subtilis* ha desarrollado un conjunto de estrategias que permiten la supervivencia bajo estas duras condiciones. Una de las estrategias, por ejemplo, es la formación de endosporas resistentes al estrés.

5.1.2. Estructura celular y metabolismo

Los *B. Subtilis* son bacilos Gram-positivos (Pérez 2000). Poseen pared celular de peptidoglicano, que es un polímero de azúcares y aminoácidos conocido como mureína. La pared celular forma la barrera entre el medio ambiente y la célula bacteriana. Es responsable también de mantener la forma de la célula y soportar la presión de turgencia interna alta de la célula (Schaechter 2006).

Estas bacterias utilizan sus flagelos para la movilidad en superficies. Se disponen de manera individual o en cadenas, secretando una capa de limo, compuesta, entre otras cosas por surfactina (Schaechter, 2006).

B. Subtilis era antes considerada estrictamente aeróbica, lo que significa que requieren oxígeno para crecer y no pueden sobrevivir por medio de fermentación. Sin embargo, estudios más recientes muestran que, efectivamente, pueden crecer en condiciones anaeróbicas haciéndolas aerobias facultativas. Por medio de fermentación puede producir butanodiol como un subproducto. El nitrógeno lo obtienen a partir de nitritos o nitratos por medio de amonificación (Schaechter, 2006)

5.1.4. Ecología de *B. Subtilis*

El principal hábitat de las bacterias del género *Bacillus* es el suelo. Estos microorganismos mesófilos aerobios se encuentran en los horizontes de suelo donde la concentración de oxígeno es más abundante y las temperaturas son relativamente suaves. Se consideran microorganismos competitivos ya que cuando el carbono, los niveles de nitrógeno y fósforo en nutrientes caen por debajo del umbral óptimo de la bacteria, estas producen esporas así como toxinas antibióticas (por ejemplo: polimixina, difficidin, Subtilina, y micobacilina) que eliminan a otras especies competidoras.

Por otro lado, cuando los nutrientes requeridos para las bacterias para crecer son abundantes, exhiben una alta actividad metabólica. Muchos *Bacillus* pueden degradar polímeros tales como proteínas, almidón, pectina y, por lo tanto, que se cree que son un factor importante en los ciclos de carbono y nitrógeno. Adicionalmente, estos microorganismos son los principales responsables del deterioro de los alimentos desempeñando un papel en la reposición de los nutrientes del suelo (Romero Jairo. 2009)

Las bacterias *B. Subtilis* forman biopelículas o *biofilms*, que son densas comunidades de organismos, sobre una superficie en la interfaz del aire y/o el agua. Algunos *biofilms* son beneficiosos ya que en ocasiones permiten el control de las infecciones de patógenos de plantas. Las comunidades de un *biofilm* forman una interacción mutualista con los sistemas de rizoma de plantas, evitando la colonización de otros microorganismos y actuando incluso como biofungicidas para beneficio de los cultivos agrícolas (Romero Jairo. 2009)

5.1.5. Patologías de *B. Subtilis*

B. Subtilis no son patógenos. Pueden contaminar los alimentos, sin embargo, rara vez dan lugar a una intoxicación alimentaria. Se utilizan en las plantas como un fungicida ya que compiten con organismos causantes de enfermedades sin afectar a los seres humanos, a pesar de que algunas cepas de *B. Subtilis* causan pudriciones en los tubérculos. Otras cepas de *B. Subtilis* son capaces de producir toxinas insecticidas (Romero Jairo. 2009)

5.1.6. Aplicación en la biotecnología e investigaciones actuales acerca de *B. Subtilis*

La actividad de producción de antibióticos fue vista en *B. Subtilis* cepa MH-4. La actividad óptima se produce a una temperatura de 37° Celsius y un pH básico de 8. El glicerol es la fuente

de carbono óptima y el ácido L-glutámico es la fuente óptima de nitrógeno (Morikawa, 2006). Además, estas bacterias secretan enzimas tales como la amilasa, la proteasa, la pululanasa, la quitinasa, la xilanasas y la lipasa entre otras. Estas enzimas se producen comercialmente y esta producción representa alrededor del 60% de las enzimas industriales producidas comercialmente (Morikawa, 2006).

Actualmente hay muchos estudios de investigación que se están haciendo respecto a *B. Subtilis*, uno de ellos se centra en la resistencia de las esporas de *B. Subtilis* al calor, la radiación y los productos químicos. Se ha encontrado que las esporas pueden sobrevivir cientos, incluso millones de años en un estado latente. El estudio investigó los factores importantes que contribuyen a la resistencia de estas esporas frente a agentes tóxicos, radiación ultravioleta, y enzimas líticas. Tanto la pared como la membrana interna resultan ser importantes, debido a su baja permeabilidad frente a los agentes tóxicos. La reparación del ADN también se determinó como crucial, ya que puede controlar el daño de ADN debido a la radiación, el calor y las toxinas. Las esporas de *B. Subtilis* también son resistentes al calor húmedo, principalmente por su bajo contenido de agua en el núcleo. Cuanto menor sea el contenido de agua del núcleo, la espora es más resistente. La información acerca de la resistencia de las esporas nos da una mejor comprensión de los métodos que pueden o no pueden ser útiles en matar las esporas (Setlow, 2006).

Por otra parte, encontramos la identificación de la enzima proteasa producida por *Bacillus Subtilis* en el trabajo de investigación “AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN Y PRODUCCION EN MASA DE LA PROTEASA ENZIMA DE *Bacillus Subtilis*” elaborado por el laboratorio de Biotecnología de la división de mejoramiento de cultivos del Instituto Central de investigación del arroz, Cuttack, Orisa en India. Allí se realizó la detección y el aislamiento de la proteasa extracelular a través de cuatro diferentes muestras de suelo recogidas en varios sitios de Bangalore (India) (Morikawa, 2006).

Como se ha demostrado este microorganismo ha sido utilizado para diversos fines, en relación al tema del presente proyecto, esta especie ha sido probada también para la degradación de aceites en industrias petroleras, como es el ejemplo del trabajo: “STUDIES ON THE POTENCIAL OF *B. Subtilis* IN THE BIODEGRADATION OF ENGINE OIL” de Warangal, India. Teniendo en cuenta que el petróleo y sus derivados son muy tóxicos para la mayoría de los organismos vivos

se prueba la eficiencia de esta bacteria para la degradación de hidrocarburos durante un periodo de 10 días con el petróleo como única fuente de carbono y energía. Después de la prueba se encontró que el *B. Subtilis* tuvieron el potencial de degradar aceite de hasta 71%, respecto a la concentración inicial dispuesta (Morikawa, 2006).

Encontramos de igual manera en el artículo: “INFORME Y EVALUACIÓN DE RESULTADOS DE LA PRUEBA REALIZADA POR EL LABORATORIO BIOCONTROL PARA LA BIOREMEDIACIÓN DE LOS BIOSOLIDOS GENERADOS EN LA PTAR EL SALITRE DE LA CIUDAD DE BOGOTA D.C.” se midieron los efectos de tres microorganismos biorremediadores comerciales (Trichobiol WP, Pseudobiol SL y Subtilin SL) sobre los coliformes fecales, *Esclerichia coli*, huevos viables de helmintos y olores ofensivos que se encuentran en los biosólidos producidos en la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales – PTAR “El Salitre” de la ciudad de Bogotá, D.C. durante 10 días continuos en el tanque de almacenamiento de los lodos digeridos.

Como resultado de este proyecto se determinó que el uso de estos tres bioremediadores (Trichobiol WP, Pseudobiol SL y Subtilin SL) resulta eficiente para mejorar las condiciones de los biosólidos generados en la planta de tratamiento de agua residuales, en especial en lo referente a la reducción de coliformes fecales y *E. coli*. Así mismo fue posible reducir los olores ofensivos, puesto que una al final se obtuvo una calificación promedio de 1,46 para las pilas y de 1,28 para los submódulos, en una escala de 0 a 5, valores que suponen supone una intensidad muy baja de olores. Finalmente los resultados obtenidos para la reducción de huevos viables de helmintos, sugieren continuar con la investigación, probando cada uno de los productos utilizados de manera individual, en diferentes dosis y frecuencia de aplicación, así como también la combinación de ellos, ya que no obtuvieron resultados concluyentes en este aspecto (Setlow, 2006).

5.2. MARCO CONCEPTUAL – TÉRMINOS RELEVANTES

5.2.1. Metabolismo

Es el conjunto de reacciones bioquímicas y procesos físico-químicos que ocurren en una célula y en el organismo. Estos complejos procesos interrelacionados son la base de la vida a escala molecular, y permiten las diversas actividades de las células: crecer, reproducirse, mantener sus

estructuras, responder a estímulos, etc. La metabolización es el proceso por el cual el organismo consigue que sustancias activas se transformen en no activas (*González 2011*)

5.2.2. Mureína o peptidoglucano

Es un copolímero formado por una secuencia alternante de N-acetil-glucosamina y el Ácido N-acetilmurámico unidos mediante enlaces. La cadena es recta y no ramificada. Constituye la estructura básica de la pared celular de las bacterias (*González 2011*)

5.2.3. Endosporas

Son células especializadas, no reproductivas, producidas por unas pocas bacterias de la división Firmicute. Su función primaria es asegurar la supervivencia en tiempos de tensión ambiental. Son extraordinariamente resistentes a la radiación (ultravioleta, X y gamma), a la desecación, a las lisozimas, al calor, a los desinfectantes químicos y a trituración mecánica. Las endosporas se encuentran comúnmente en el suelo y el agua donde sobreviven durante largos periodos de tiempo (*González 2011*)

5.2.4. Bioremediación

Proceso que utiliza las habilidades catalíticas de los organismos vivos para degradar y transformar contaminantes tanto en ecosistemas terrestres como acuáticos, presenta un enorme potencial en la mitigación de la contaminación ambiental. La bioremediación se ha centrado en la explotación de la diversidad genética y versatilidad metabólica que caracteriza a las bacterias para transformar contaminantes en productos inocuos o, en su defecto, menos tóxicos, que pueden integrarse en los ciclos biogeoquímicos naturales (*González 2011*)

Técnicas de bioremediación

Bioaugmentación: Consiste en la adición al medio (suelo, agua) al objeto de optimizar la biodegradación de microorganismos autóctonos **vivos** especializados, cuya eficiencia en la degradación del contaminante esté probada. Se incrementa la población nativa de microorganismos del sistema incorporando un inóculo de otros adaptados selectivamente, desarrollados para que tengan la capacidad para degradar los contaminantes en cuestión, compuestos previamente considerados como no o difícilmente biodegradables. Estos microorganismos pueden ser naturales o modificados genéticamente (*González 2011*)

Bioestimulación: Responde a la idea de aplicar bioremediación, pero creando condiciones óptimas. Es decir intentar que se alcancen las condiciones para que la biodegradación transcurra de forma idónea. La bioestimulación consiste en estimular a los microorganismos autóctonos de un ambiente natural por medio de la adición de nutrientes y otros aditivos, de humedad y aireación del sistema para así mejorar la eliminación de los contaminantes (González 2011)

Degradación enzimática: Consiste en agregar enzimas al sitio contaminado con el fin de degradar las sustancias nocivas. Estas enzimas se obtienen de microorganismos especialmente diseñados para así obtener grandes cantidades y de alta especificidad. Una de las ventajas de las enzimas es que las reacciones es que las reacciones mediadas por éstas poseen tasas de velocidad significativamente mayores que las reacciones en las cuales no se encuentran estos catalizadores (González 2011)

Fito remediación: Es un término utilizado para describir el tratamiento de problemas ambientales a través de la utilización de plantas. Es la descomposición de los suelos, la depuración de las aguas residuales o la limpieza del aire interior usando plantas basculantes algas u hongos y por extensión ecosistemas que contienen estas plantas (González 2011)

5.2.5. Subtilin

Es un agente microbiano elaborado a base de *B. Subtilis*, bacteria biorremediadora utilizada para el control de olores, reducción y/o eliminación de coliformes fecales, salmonela, huevos viables de helmintos y metales pesados, descomposición de materia orgánica en biosólidos, lodos, lixiviados, aguas residuales y materiales orgánicos, usados en los procesos de compostaje. Algunas especificidades de calidad para el uso de este producto son: recuento viable de colonias es de mínimo $1,0 \times 10^8$ UFC/c.c. y pH de un rango entre 5,0 y 7,5 unidades (González 2011)

5.4. PARAMETROS MICROBIOLÓGICOS ASOCIADOS A LA CALIDAD DEL AGUA

5.4.1. Coliformes totales

Se define como un grupo de bacterias en forma de bacilo, pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, Gram negativas, aerobias y anaerobias facultativas, que no forman esporas, con capacidad de fermentar la lactosa y otros azúcares con producción de ácido y de gas a una

temperatura entre 35 y 37°C durante un lapso de 24 a 48 horas. Los géneros pertenecientes al grupo Coliforme son *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Citrobacter* (González 2011).

Entre las principales características de este grupo está su resistencia a condiciones ambientales adversas, la cual es igual o superior a la de los patógenos; además, se comportan de manera similar a éstos. Se encuentran también en el intestino de animales de sangre caliente, por lo cual son un buen indicador de polución animal. Adicionalmente, los coliformes se pueden encontrar en el suelo, viviendo como saprofitos independientes; de esta manera para separar los géneros de origen fecal de los saprofitos independientes, se les dio el nombre a los primeros de coliformes fecales y a los segundos de coliformes totales. Cada ser humano excreta de 100.000 a 400.000 millones de coliformes por día (González 2011)

Tabla 1. Comparación del promedio de la densidad de Coliformes fecales en heces animales.

HECES	COLIFORMES FECALES DENSIDAD/GRAMO
Hombre	13 000 000
Vaca	230 000
Pollo	1 300 000
Perro	23 000 000
Gato	7 900 000
Cerdo	3 300 000
Oveja	16 000 000
Ratón	330 000

FUENTE: Microbiología del agua (González, 2011)

5.4.2. *Escherichia coli*

Es una de las especies bacterianas más minuciosamente estudiadas, y no solamente por sus capacidades patogénicas, sino también como sustrato y modelo de investigaciones metabólicas, genéticas, poblacionales y de diversa índole (Neidhardt, 1999). Forma parte de la familia Enterobacteriaceae (Ewing, 1985). Se trata de bacterias de rápido crecimiento y amplia

distribución en el suelo, el agua, vegetales y gran variedad de animales. En conjunto, la importancia de las enterobacterias en patología humana puede cuantificarse constatando que constituyen el 50% aproximadamente de todos los aislamientos clínicamente significativos en los laboratorios microbiológicos, y hasta el 80% de todos los bacilos Gram negativos identificados (Drasar y Hill, 1974).

E. coli coloniza el tracto gastrointestinal a las pocas horas de vida de los seres humanos, y establece con el huésped una relación estable de mutuo beneficio (Drasar y Hill, 1974). Como integrante de la flora normal del hombre y de muchos animales, se lo considera un germen indicador de contaminación fecal cuando está presente en el ambiente, agua y alimentos, junto con otros similares agrupados bajo la denominación de "bacterias coliformes" arriba definidos.

5.5. PARAMETROS FISICOQUIMICOS ASOCIADOS AL AGUA

5.5.1. Conductividad

La conductividad del agua es una expresión numérica de su habilidad para transportar una corriente eléctrica, que depende de la concentración total de sustancias disueltas ionizadas en el agua y de la temperatura a la cual se haga la determinación. Por tanto, cualquier cambio en la cantidad de sustancias disueltas, en la movilidad de los iones disueltos y en su valencia, implica un cambio en la conductividad. Por esta razón, el valor de la conductividad se usa mucho en análisis de aguas para obtener un estimativo rápido del contenido de sólidos disueltos (Romero 2009).

La medida de la conductividad permite evaluar de forma rápida y aproximada la mineralización global del agua y seguir la evolución. En general la conductividad se eleva de forma progresiva de arriba hacia abajo en los cursos de agua; las divergencias son tanto más importante cuanto más débil es la mineralización inicial, en particular en las zonas con sustrato ácido o subsuelo silíceo. En el caso de un control de distribución de agua potable, el interés de este método no reside en una única medida sino en una serie de determinaciones o registros sin interrupción que permitirán detectar las variaciones de composición que podrán indicar la llegada de agua susceptible de estar contaminada. En las aguas superficiales y los vertidos de aguas residuales, se pueden producir con rapidez durante el día modificaciones importantes en la conductividad. Se puede inferir que la situación es anormal cuando la medida indica más allá de 2000 $\mu\text{s}/\text{cm}$. (Rodier 2009).

La tabla siguiente ofrece algunas indicaciones sobre la relación que existe entre la mineralización y la conductividad:

Tabla 2. Relación mineralización - conductividad.

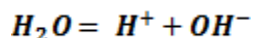
Conductividad < 100 $\mu\text{s}/\text{cm}$	Mineralización muy débil
100 $\mu\text{s}/\text{cm}$ < Conductividad < 200 $\mu\text{s}/\text{cm}$	Mineralización débil
200 $\mu\text{s}/\text{cm}$ < Conductividad < 333 $\mu\text{s}/\text{cm}$	Mineralización media
333 $\mu\text{s}/\text{cm}$ < Conductividad < 666 $\mu\text{s}/\text{cm}$	Mineralización media acentuada
666 $\mu\text{s}/\text{cm}$ < Conductividad < 1000 $\mu\text{s}/\text{cm}$	Mineralización importante
Conductividad > 1000 $\mu\text{s}/\text{cm}$	Mineralización elevada

FUENTE: Análisis del agua (Rodier, 2009).

5.5.2. Potencial de hidrogeniones

El termino pH es una forma de expresar la concentración del ion hidrogeno o, más exactamente, la actividad del anión hidrogeno (H^+). En general se usa para expresar la intensidad de la condición ácida o alcalina de una solución, sin que esto quiera decir que mida la acidez total o la alcalinidad total (Romero, 2009).

La disociación iónica del agua puede representarse por el equilibrio:



Su constante de disociación será:

$$K_i = \frac{[\text{H}^+][\text{OH}^-]}{[\text{H}_2\text{O}]}$$

En agua pura la magnitud de su ionización es muy pequeña. Para el equilibrio solo están presentes 10^{-7} moles/L de H^+ y de OH^- , lo cual permite suponer que la actividad o concentración del agua es esencialmente constante; así la ecuación anterior se convierte en:

$$K_w = [\text{H}^+][\text{OH}^-] = 10^{-7} \times 10^{-7} = 10^{-14}$$

La constante Kw es conocida como la constante de ionización del agua y su valor debe satisfacerse en cualquier solución acuosa. Por tanto cuando se añade un ácido al agua, este se ioniza en ella, aumentando la concentración de iones H⁺; consecuentemente, debe disminuir la concentración de iones OH⁻ para que Kw se mantenga constante. Es importante recordar que en ningún caso la concentración de ion H⁺ o de ion OH⁻ puede reducirse a cero, no importa lo acida o básica que sea la solución (Romero 2009).

El pH se define como el logaritmo del inverso de la concentración del ion hidrogeno, o sea:

$$pH = \log \frac{1}{[H^+]}$$

$$pH = -\log[H^+]$$

(Romero, 2009).

De allí la escala de 1 a 14 de las unidades de este indicador.

5.5.3. Agua residual doméstica (ARD)

El término agua residual define un tipo de agua que está contaminada con sustancias fecales y orina, procedentes de desechos orgánicos humanos o animales. Su importancia es tal que requiere sistemas de canalización, tratamiento y desalojo.

A las aguas residuales también se les llama aguas servidas, fecales o cloacales. Son residuales, habiendo sido usada el agua, constituyen un residuo, algo que no sirve para el usuario directo; y cloacales porque son transportadas mediante cloacas (del latín *cloaca*, alcantarilla), nombre que se le da habitualmente al colector. Algunos autores hacen una diferencia entre aguas servidas y aguas residuales en el sentido que las primeras solo provendrían del uso doméstico y las segundas corresponderían a la mezcla de aguas domésticas e industriales. En todo caso, están constituidas por todas aquellas aguas que son conducidas por el alcantarillado e incluyen, a veces, las aguas de lluvia y las infiltraciones de agua del terreno identificado (Romero 2009).

6. MARCO LEGAL

6.1. MATRIZ LEGAL AMBIENTAL

Normativa	Año	Autoridad que Emite	Tema	Contenido	Artículos Aplicables
-----------	-----	---------------------	------	-----------	----------------------

<u>DECRETO 2811</u>	1974	MINISTERIO DE AGRICULTURA	AGUA	Por el cual se dicta el Código Nacional de Recursos Naturales.	Artículos 135, 136 y 148
<u>DECRETO 1449</u>	1977	EL PRESIDENTE DE LA REPÚBLICA	AGUA	Por el cual se reglamenta parcialmente el inciso 1 del numeral 5 del artículo 56 de la Ley 135 de 1961 y Decreto-Ley 2811 de 1974.	Artículo 2
<u>DECRETO 1541</u>	1978	MINISTERIO DE AGRICULTURA	AGUA	Por el cual se reglamenta la Parte III del Libro II del Decreto - Ley 2811 de 1974: "De las aguas no marítimas" y parcialmente la Ley 23 de 1973.	Artículos 143 y 145
<u>DECRETO 1594</u>	1984	MINISTERIO DE AGRICULTURA	AGUA	por el cual se reglamenta parcialmente el Título I de la Ley 09 de 1979, así como el Capítulo II del Título VI - Parte III - Libro II y el Título III de la Parte III Libro I del Decreto 2811 de 1974 en cuanto a usos del agua y residuos líquidos.	Artículos 20 y 21
<u>DECRETO 3930</u>	2010	MINISTERIO DE AMBIENTE, VIVIENDA Y DESARROLLO TERRITORIAL	AGUA	Por el cual se reglamenta parcialmente el Título I de la Ley 9ª de 1979, así como el Capítulo II del Título VI -Parte III- Libro II del Decreto-ley 2811 de 1974 en cuanto a usos del agua y residuos líquidos y se dictan otras disposiciones.	Artículos 1, 2, 24, 25, 38 y 41
<u>DECRETO 4728</u>	2010	MINISTERIO DE AMBIENTE, VIVIENDA Y DESARROLLO TERRITORIAL	AGUA	Por el cual se modifica parcialmente el Decreto 3930 de 2010.	Artículos 2 y 34
<u>DECRETO 3102</u>	1997	MINISTERIO DE DESARROLLO ECONÓMICO	AGUA	Por el cual se reglamenta el artículo 15 de la Ley 373 de 1997 en relación con la instalación de equipos, sistemas e implementos de bajo consumo de agua.	Artículos 2, 3, 4, 6 y 7.
<u>LEY 373</u>	1997	EL CONGRESO DE COLOMBIA	AGUA	Por la cual se establece el programa para el uso eficiente y ahorro del agua Planes municipales y regionales.	Artículo 1
<u>LEY 9</u>	1979	EL CONGRESO DE COLOMBIA	AGUA	Por la cual se dictan Medidas Sanitarias.	Artículos 1 y 21

6.1.1. Marco geográfico

Es de gran importancia conocer la información necesaria del cuerpo de agua en donde se realizará el mecanismo de bioremediación

UBICACIÓN DEL CONJUNTO RESIDENCIAL MIRAFLORES: Este ocupa el sector Norte de la ciudad con una dirección Calle 128c con carrera 62 costado norte, correspondiente a la localidad de suba (numero 11)

LIMITES: Al norte está rodeado por zonas verdes, Al Este por zonas verde, Al sur con Kr 78, Al Oeste calle 28 ABIS y Kr 78 A

7. TIPO DE INVESTIGACIÓN

Los tipos de investigación que se utilizó en el desarrollo de este proyecto de investigación fue la combinación del estudio descriptivo y de correlación. El primero debido a que tiene como propósito describir situaciones y eventos, que para el caso se describirá el procedimiento utilizado (desde la toma de muestra) para conocer el comportamiento de la bacteria *B. Subtillis* en muestras de agua. Adicional a esta metodología se recurrirá al estudio correlacional que pretende responder a preguntas de investigación; además tiene como propósito medir el grado de relación que existe entre dos o más conceptos o variables que para este proyecto de investigación se entenderá como la variable independiente la cepa de la bacteria *B. Subtillis* y como variable dependiente las concentraciones de coliformes fecales y *E. coli* determinado por las unidades UFC/100 ml. La utilidad y el propósito principal de los estudios correlacionales son saber cómo se pueden comportar un concepto o variable (UFC/100 ml) conociendo el comportamiento de una u otras variables relacionadas (*Bacillus Subtillis*).

8. MATERIALES Y MÉTODOS

Las etapas que se desarrollaron en la realización del presente proyecto de investigación se presentan a continuación en la tabla 3:

Tabla 3. Etapas en el desarrollo del proyecto de investigación.

Fechas	Etapas
MAYO 25 A 19 DE JUNIO 2014	Calibración de equipo, Levantamiento de información geográfica,
19 DE JUNIO A 21 JUNIO 2014	Toma de muestras, Preservación de las muestras, Registro de datos y fotos, Medición in situ de la muestra, Embalaje de la muestra y refrigeración
19 DE JUNIO A 27 JUNIO 2014	Lectura de muestra, se realiza cada dos días
21 JUNIO 2014	Elaboración Montaje, Análisis muestra inicial

21 JUNIO 2014	Puesta en marcha, Control de las muestras
27 JUNIO 2014	Revisión bibliográfica
29 JUNIO A 20 JULIO 2014	Trabajo de campo
20 DE JULIO A 07 Agosto de 2014	Seguimiento y Revisión del trabajo
09 de Agosto al 15 Agosto 2014	Toma de segunda prueba
09 de Agosto 2014	Calibración de equipo, Toma de muestras, Preservación de las muestras, Registro de datos y fotos, Medición in situ de la muestra, Embalaje de la muestra y refrigeración
09 de Agosto A 15 de Agosto 2014	Lectura de muestra, se realiza cada dos días
15 de Agosto A 19 Septiembre 2014	Trabajo de campo
19 Septiembre A 20 Octubre 2014	Seguimiento y Revisión del trabajo
20 Octubre A 24 Octubre 2014	Análisis y resultados
24 Octubre A 20 Noviembre 2014	Seguimiento y Revisión del trabajo
22 Noviembre A 19 Diciembre 2014	Elaboración del documento final

En primera medida frente a la fase de campo se realizó el reconocimiento del área.

A continuación se muestra el correspondiente registro fotográfico que permite evidenciar los puntos escogidos para la toma de muestras.



Fotografía 1. Reconocimiento de la PTARD: Entrada Al Sistema del conjunto residencial Miraflores

Fuente. Autor 19 de junio 2014



Fotografía 2. Toma de muestra PTARD entrada al sistema del conjunto residencial Miraflores

Fuente. Autor 19 de junio 2014



Fotografía 3. Reconocimiento de la PTARD salida del sistema del conjunto residencial Miraflores

Fuente: Autor 19 de junio 2014



Fotografía 4. Toma de muestra de la PTARD salida del sistema del conjunto residencial Miraflores

Fuente: Autor 19 de junio de 2014



Fotografía 5. Medición de los Sólidos Sedimentables a la entrada de la PTARD del conjunto residencial Miraflores

Fuente: Autor, 19 de junio 2014



Fotografía 6. Comparación de Solido Sedimentable de la salida de la PTARD sistema del conjunto residencial Miraflores

Fuente: Autor, 19 de junio 2014

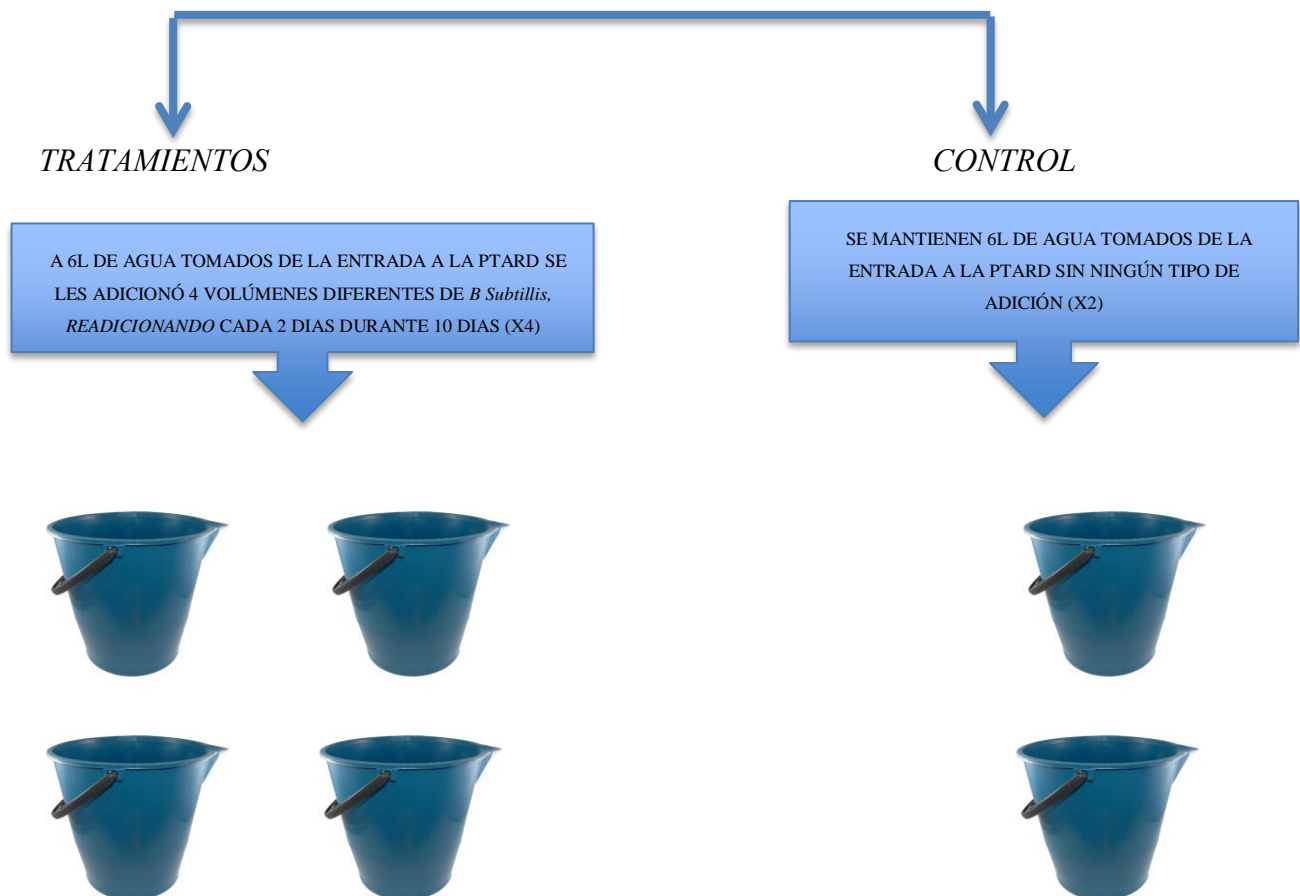
9. CARACTERISTICAS DE LA PLANTA DE AGUA RESIDUAL DOMESTICA DEL CONJUNTO MIRAFLORES

9.1 Sistema de Tratamiento Primario

Esta planta tiene una capacidad de tratamiento de agua de 12 casas en cada casa hay 4 personas, adicional a esto también trata productos de lavado de zonas comunes. Uso doméstico el cual contempla baños, cocina y lavado de ropa, Es un sistema de tratamiento primario que permite remover material en suspensión, excepto material coloidal o sustancias disueltas presentes en el agua. Este tratamiento primario permite quitar entre el 60 a 70% de solidos suspendidos totales a la salida del tanque, de igual manera retiene grasas y hasta un 30% de la DBO (Demanda Bioquímica de Oxígeno).

Presenta una dosificación de cloro en concentraciones mínimas (1.0 g/l), efecto que se busca en esta etapa es la disminución significativa de bacterias Coliformes tales como Salmonella o Síguela mediante el empleo de agentes desinfectantes como cloro o hipoclorito sodio Es un sistema al aire libre construido por pozos sépticos en material de concreto.

9.1.2 Bioremediacion de aguas residuales domesticas mediante la aplicación del *Bacillus Subtilis*





Fotografía 7. Montaje y diseño experimental

Fuente: Autor 19 de junio de 2014



Fotografía 8. Oxigenación de las muestras tomadas a la entrada de la PTARD del sistema del conjunto residencial Miraflores

Fuente: Autor, 19 de junio de 2014

La aplicación del *B Subtilis* se realizó mediante el uso de un gotero de 10 ml. La dosis aplicada fue de 2.0 y de 3.0 ml, para un volumen por balde de 6 litro, es decir que se aplicó un total de 5.0 ml cada dos días, En dos baldes de plástico con una capacidad de los dos baldes de 12 Litros,

Antes de iniciar el tratamiento, se tomaron dos muestras sin producto para tenerlos como blanco control durante el proceso de evaluación de resultados.

La prueba culminó con la toma de la última muestra realizada a los 8 días, lo que ocurrió el 27 de junio/2014. Se tomaron un total de 5 muestras, las cuales fueron enviadas al laboratorio ANTEK S.A en BOGOTA D.C

De igual manera se realiza una segunda prueba, con el fin de complementar el análisis. Esta segunda prueba se realiza, en la fecha 09 al 15 de agosto de 2014, manejando el mismo método de la prueba inicial pero con concentraciones de *B. Subtillis* diferentes de 6.0 y de 9.0 ml, para un volumen por balde de 6 litros, y se toman un total de 4 muestras, de igual manera estas muestras fueron enviada al laboratorio ANTEK S.AS en BOGOTA D.C

9.1.3. Parámetros evaluados

Estos parámetros fueron evaluados mediante los resultados obtenidos en análisis de laboratorio (Antek S.A.S) de muestras tomadas a los 19, 21, 23 , 25, 27 de junio de 2014 de igual manera se realizó una segunda prueba los días 9, 11,13, 15 de agosto de 2014 días de iniciada la prueba. Como blanco se tomaron dos muestras libres de producto, antes de iniciar la prueba.

Tabla 4. Parámetros evaluados

Oxígeno Disuelto	Coliformes totales
pH	<i>Escherichia coli</i>
Conductividad Eléctrica	Mohos
Sólidos Suspendidos Totales	Levaduras
Temperatura de la Muestra	Mesófilos
Caudal de entrada PTARD	Olores ofensivos (0 – 10)

9.1.4. Medición de parámetros *in situ*

La medición de parámetros en campo (pH, Temperatura, Oxígeno Disuelto, Conductividad, Sólidos Suspendidos Totales) se realizó mediante equipos portátiles, con una frecuencia igual de treinta (30) minutos durante dos horas cada dos días obteniendo una cantidad representativa de datos para el posterior análisis, se debe contar con los equipos portátiles, los cuales operan así: introduzca los electrodos del equipo en el recipiente que contiene la muestra a ser analizada. Oprima la tecla MODE. Espere a que los valores en la pantalla de los equipos se establezca (el valor deje de titilar). Oprima la tecla READ. Cuando se establezca la medición, registre los valores en el formato de toma de datos de campo.

Si se va a determinar sólidos sedimentables, se debe contar con un cono Imhoff, llene el cono a la marca de 1 L con una muestra bien mezclada. Deje sedimentar durante 45 minutos, agitar suavemente la muestra cerca de las paredes del cono con una varilla o por agitación, dejar reposar durante 15 minutos, leer y registrar el volumen de sólidos sedimentables. Lave los electrodos con abundante agua ya que los valores extremos que pueden presentar los efluentes los deterioran más rápidamente. (Antek S.A.S) (Ver fotos 5-6)



Fotografía 9. Análisis in situ de la PTARD entrada al sistema del conjunto residencial Miraflores

Fuente: Autor, 19 de junio 2014

9.1.5. Medición volumétrica Manual: caudal de entrada al sistema

Para este tipo de medición se requiere de un cronometro y un recipiente aforado. El procedimiento a seguir es tomar un volumen de muestra cualquiera y medir el tiempo transcurrido desde que se introduce a la descarga hasta que se retira de ella; la relación de estos dos valores permite conocer el caudal en ese instante de tiempo. El cálculo del caudal es el siguiente:

$$Q=V/t$$

Este método tiene la ventaja de ser el más sencillo y confiable, siempre y cuando el lugar donde se realice el aforo garantice que el recipiente llegue todo el volumen de agua que sale por la descarga, se debe evitar represamiento que promoverán la acumulación de sólidos y grasas. (Antek S.A.S)



Fotografía 12. Medición volumétrica Manual

Fuente: Autor, 19 de junio 2014



Fotografía 10. Análisis de Coliformes Totales y *Escherichia coli*

Fuente: Autor, 19 de junio 2014



Fotografía 10. Recuento De Mohos y Levaduras

Fuente: Autor, 19 de junio 2014

9.1.8. Olores

Por otro lado la presencia de olores ofensivos se realizó mediante el método de percepción olfativa, para lo cual se llevaron diferentes personas en diferentes días y se estableció una escala de 0 a 5 (*Escala de intensidades para la evaluación del tono hedónico*), en donde 5 representa la máxima percepción de olores y 0 ninguna percepción. Este ejercicio se realizó en el sitio del montaje del proyecto.

Tabla 5. Primera prueba del 19 al 27 de junio de 2014 Y Segunda prueba del 09 al 15 de agosto de 2014

NUMER DE VALDES	CONSETRACION SUBTILIN PRUEBA 1	CONSETRACION SUBTILIN PRUEBA 2
1	2 ml	6 ml
1	3 ml	9 ml
2	Control	Control

La concentración indicada de *B Subtilis* se añadió cada 2 días.

10. ANALISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

10.1. REDUCCION Y/O ELIMINACIÓN DE OLORES

Dado que la percepción de los olores varía mucho en cada persona, para el estudio se realizaron pruebas de percepción con la colaboración de hombres y mujeres adultos (18 a 27 años) con el fin de evitar sesgos en los resultados, a partir de los cuales nos podemos dar cuenta de que hay una disminución de los olores ofensivos emitidos por las muestras tratadas con Subtilin, hasta llegar a un grado 0 manteniendo una intensidad sin olor. Esto nos permite inferir que hay una reducción significativa de los olores ofensivos cuando se incluye el Subtilin en el tratamiento de aguas residuales domésticas.

Tabla 6. Escala de intensidades para la evaluación del tono hedónico

GRADO	INTENSIDAD
0	Sin olor
1	Muy leve
2	Débil
3	Fácilmente notable
4	Fuerte
5	Muy fuerte

Fuente: Implementación del método de monitoreo y análisis de olores ofensivos en dos localidades del valle de aburra afectadas por el procesado de sebo en el año 2014

Tabla 7. Frecuencia de evaluadores de toma de muestra primera prueba

Evaluador	Tipo de muestra	1	2	3	4	5	Intensidad Promedio
H7	T (2ml)	3	2	1	1	0	Sin olor
H7	T (3ml)	3	2	1	1	1	Sin olor
H7	T (6ml)	3	3	2	2	0	Muy leve
H7	T (9ml)	3	3	3	1	0	Muy leve
H7	C1	3	4	4	4	4	Fuerte
H7	C2	3	4	4	4	4	Fuerte

11. ANALISIS MICROBIOLÓGICO

11.1. AGUA RESIDUAL DOMÉSTICA

La caracterización microbiológica del agua residual de la caja de inspección perteneciente al conjunto residencial Miraflores, fue ejecutada durante el mes de junio y de agosto del 2014. Los datos fueron reportados en ufc/100 en números ordinarios estos datos fueron convertidos en LN para facilitar su interpretación en las gráficas realizadas

Las poblaciones registradas de Coliformes totales, durante el primer día de monitoreo del mes de junio, no evidencia variación a pesar de la adición del *B. Subtilis* en el agua residual doméstica. No obstante, después de dos días, se evidencia la acción del fungicida/bactericida aplicado, de modo que finalmente, el día 27 de junio hay una marcada disminución poblacional de éstos microorganismos, como se observa en las tablas 10 - 11 y en las figuras 1.

Tabla 8. Comparación de los recuentos microbiológicos para Coliformes totales.

MUESTRA	CONTROL 1	2ml de Subtilin	3ml de Subtilin	Control 2	6ml de Subtilin	9ml de Subtilin
1	150.000.000	150.000.000	150.000.000	160.000.000	130.000.000	110.000.000
2	160.000.000	17.000.000	22.000.000	165.000.000	15.000.000	12.000.000

3	172.000.000	780.000	22.000	178.000.000	400.000	200.000
4	195.000.000	63.000	9600	195.000.000	52.000	30.000
5	183.000.000	37.000	1.300			

Tabla 9. Comparación del recuento de Coliformes totales, valores expresados LN.

Muestra	Control 1	2ml de Subtilin	3ml de Subtilin	Control 2	6ml de Subtilin	9ml de Subtilin
1	18,83	18,83	18,83	18,89	18,68	18,52
2	18,89	16,65	16,91	18,92	16,52	16,3
3	18,96	13,57	10,00	19	12,9	12,21
4	19,09	11,05	9,17	19,09	10,86	10,31
5	19,02	10,52	7,17			

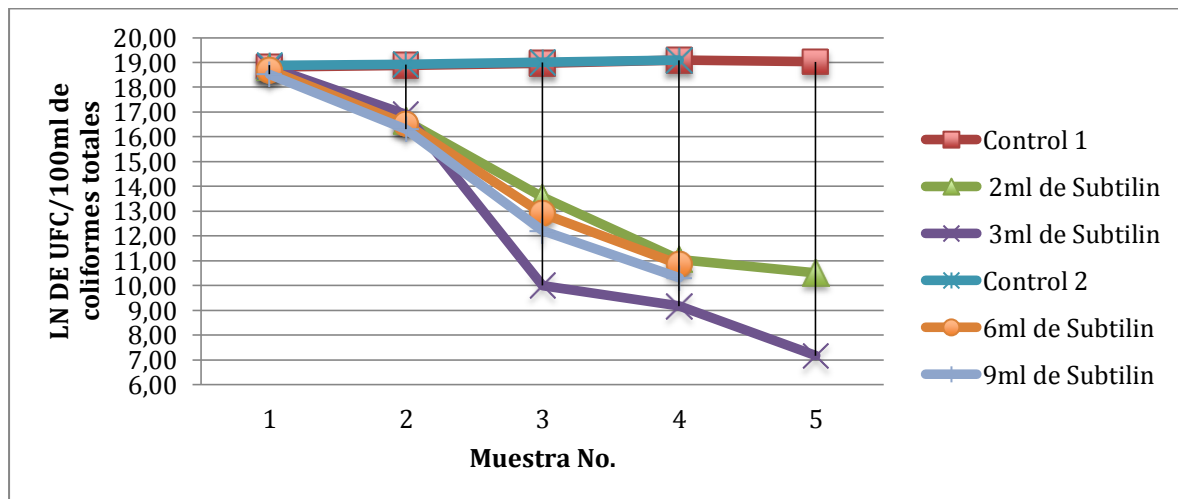


Figura 1. Tendencia poblacional de Coliformes totales (LN) para los diferentes tratamientos (dosificaciones de Subtilin) con dos controles negativos, sin adición del producto.

En esta gráfica se observa que todas las concentraciones adicionadas de Subtilin tienen un comportamiento muy similar y es la de 3 ml la que logra una cantidad de coliformes menor que las demás adiciones, siendo esta la más adecuada para el tratamiento de coliformes en el agua.

Tabla 10. Comparación de los recuentos microbiológicos para E coli.

MUESTRA	CONTROL 1	2ml de Subtilin	3ml de Subtilin	Control 2	6ml de Subtilin	9ml de Subtilin
1	660.000	660.000	660.000	670.000	390.000	200.000
2	680.000	6.300	320.000	694.000	5.700	3.900
3	780.000	42.000	4.800	730.000	30.000	10.000
4	990.000	7.600	1.500	890.000	5.300	4.200
5	850.000	2.100	720			

Tabla 11. Comparación del recuento de E coli, valores expresados LN

Muestra	control 1	2 ml de Subtilin	3 ml de Subtilin	control 2	6 ml de Subtilin	9 ml de Subtilin
1	13,4	13,4	13,4	13,42	12,87	12,21
2	13,43	8,75	12,68	13,45	8,65	8,27
3	13,57	10,65	8,48	13,5	10,31	9,21
4	13,81	8,94	7,31	13,7	8,58	8,34
5	13,65	7,65	6,58			

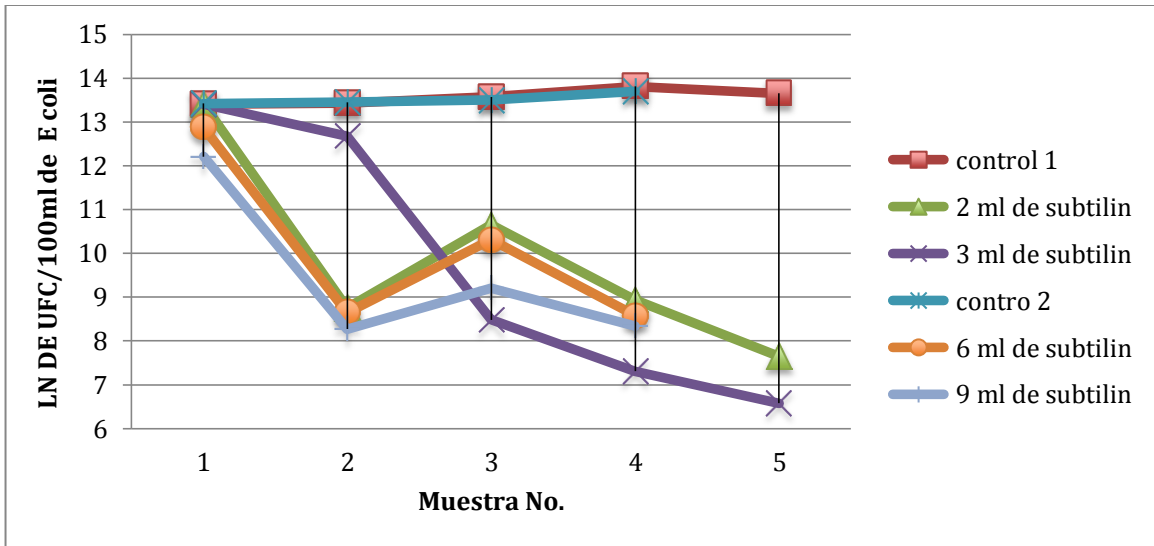


Figura 2. Tendencia poblacional de E coli (LN) para los diferentes tratamientos (dosificaciones de Subtilin) con dos controles negativos, sin adición del producto.

En aguas residuales domésticas es de esperarse poblaciones para el E. Coli, ya que provienen del intestino de animales.

Este ensayo muestra que para las adiciones de 2, 6 y 9 ml el comportamiento es bastante similar, mostrándose un aumento en la muestra 3, pero en general una disminución de la presencia de E. coli, sin embargo, para el ensayo de 3 ml de Subtilin se observa un comportamiento monótono, es decir, siempre está en descenso y de hecho al final alcanza valores menores que las otras cantidades, siendo entonces el volumen de adición más adecuado.

Tabla 12. Comparación de los recuentos microbiológicos para Mohos.

Muestra	control 1	2 ml de Subtilin	3 ml de Subtilin	control 2	6 ml de Subtilin	9 ml de Subtilin
1	2.100.000	2.100.000	2.100.000	2.700.000	1.200.000	9.000.000
2	2.700.000	960.000	1.100.000	2.990.000	800.000	600.000
3	3.600.000	730.000	18.000	3.780.000	480.000	400.000
4	4.200.000	28.000	12.000	5.340.000	15.000	8.000
5	3.200.000	9.500	980			

Tabla 13. Comparación del recuento de mohos, valores expresados LN

Muestra	control 1	2 ml de Subtilin	3 ml de Subtilin	control 2	6 ml de Subtilin	9 ml de Subtilin
1	14,56	14,56	14,56	14,81	14	16,01

2	14,81	13,77	13,91	14,91	13,59	13,3
3	15,1	13,5	9,8	15,15	13,08	12,9
4	15,25	10,24	9,39	15,49	9,62	8,99
5	14,98	9,16	6,89			

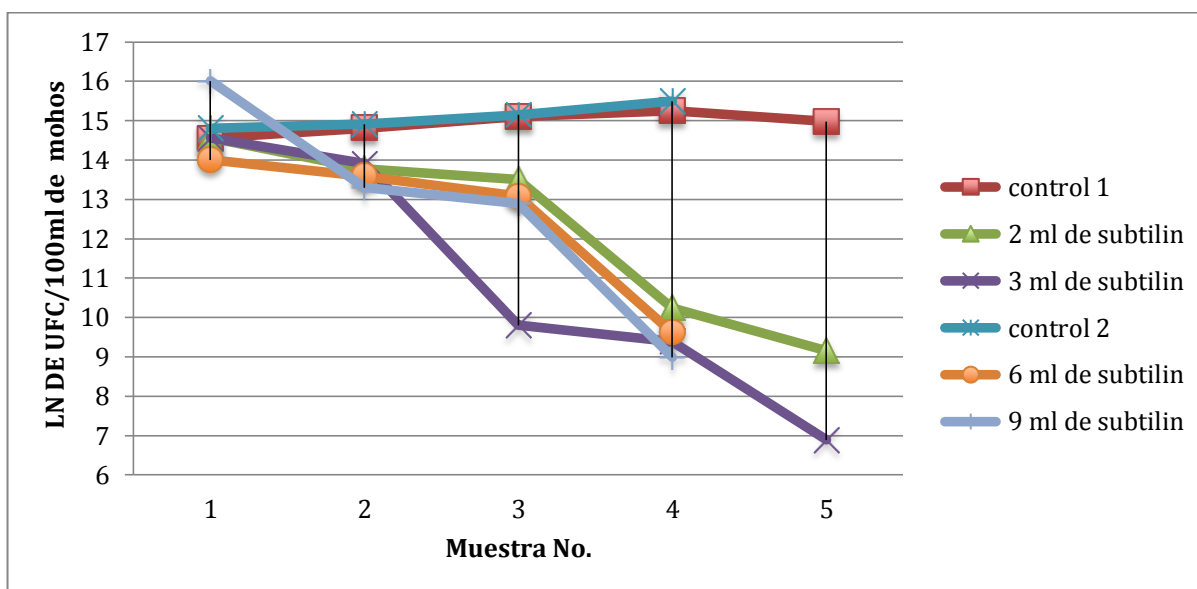


Figura 3. Tendencia poblacional de Mohos (LN) para los diferentes tratamientos (dosificaciones de Subtilin) con dos controles negativos, sin adición del producto.

Con un resultado similar al de las levaduras los diferentes ensayos tienen un efecto similar, pero el de 3 ml lo logra en un menor tiempo, por lo que se considera igualmente para este ensayo la mejor opción.

Tabla 14. Comparación de los recuentos microbiológicos par Levaduras.

Muestra	Control 1	2 ml de Subtilin	3 ml de Subtilin	control 2	6 ml de Subtilin	9 ml de Subtilin
1	460000	460000	460000	560.000	300.000	200.000
2	490000	78000	110000	640.000	60.000	50.000
3	560000	23000	710	790.000	20.000	18.000
4	640000	1200	630	879.000	800	600
5	580000	540	210			

Tabla 15. Comparación del recuento de levaduras, valores expresados LN

Muestra	Control 1	2 ml de Subtilin	3 ml de Subtilin	control 2	6 ml de Subtilin	9 ml de Subtilin
1	13,04	13,04	13,04	13,24	12,61	12,21
2	13,1	11,26	11,61	13,37	11	10,82
3	13,24	10,04	6,57	13,58	9,9	9,8
4	13,37	7,09	6,45	13,69	6,68	6,4
5	13,27	6,29	5,35			

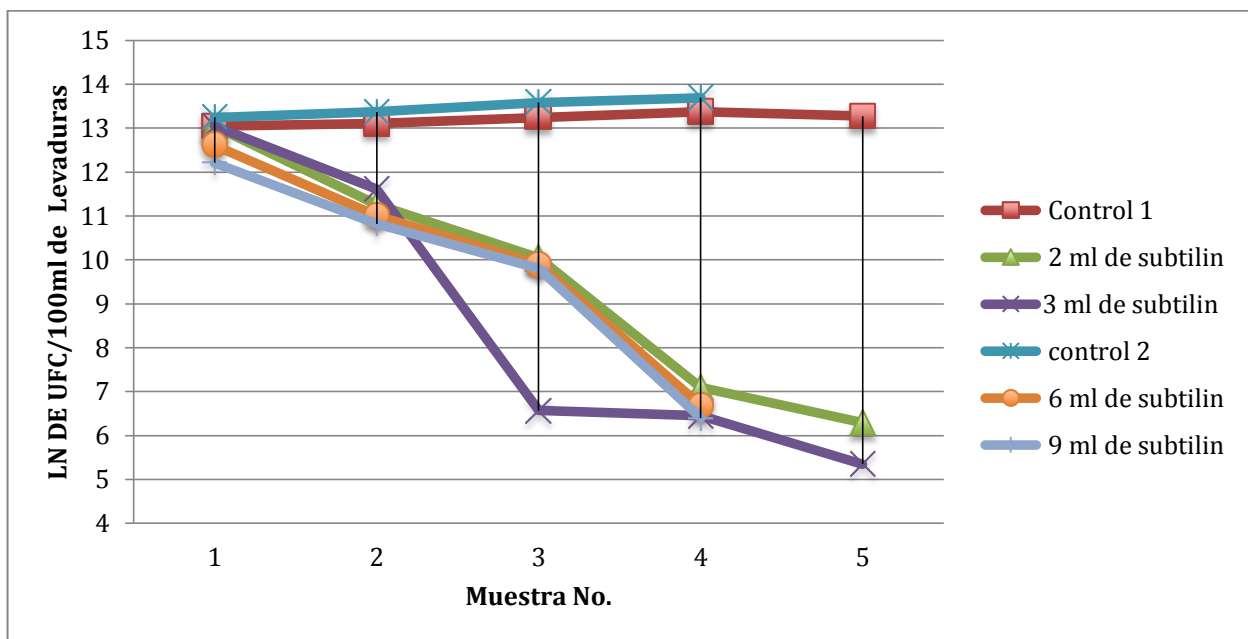


Figura 4. Tendencia poblacional de levaduras (LN) para los diferentes tratamientos (dosificaciones de Subtilin) con dos controles negativos, sin adición del producto.

Para las levaduras vemos que los resultados de las diferentes concentraciones no tienen mayores diferencias, sin embargo la adición de 3 ml es la que obtiene resultados más rápidamente, por lo que ésta sería la más recomendada, pues actúa más rápido.

Tabla 16. Comparación de los recuentos microbiológicos para Mesófilos.

Muestra	Control 1	2 ml de Subtilin	3 ml de Subtilin	control 2	6 ml de Subtilin	9 ml de Subtilin
1	11.000.000.000	11000000000	11000000000	12.000.000.000	9.000.000.000	7.000.000.000

2	12.000.000.000	260000	120000	13.100.000.000	20.000.000	12.000.000
3	137.000.000.000	1100000	340000	15.200.000.000	900.000	700.000
4	146.000.000.000	580000000	27000000	17.100.000.000	400.000.000	300.000.000
5	129.000.000.000	98000	98000			

Tabla 17. Comparación del recuento de mesófilos, valores expresados LN

Muestra	Control 1	2 ml de Subtilin	3 ml de Subtilin	control 2	6 ml de Subtilin	9 ml de Subtilin
1	23,12	23,12	23,12	23,21	22,92	22,67
2	23,21	12,47	11,7	23,3	16,81	16,3
3	25,64	13,91	12,74	23,44	13,71	13,46
4	25,71	20,18	17,11	23,56	19,81	19,52
5	25,58	11,49	11,49			

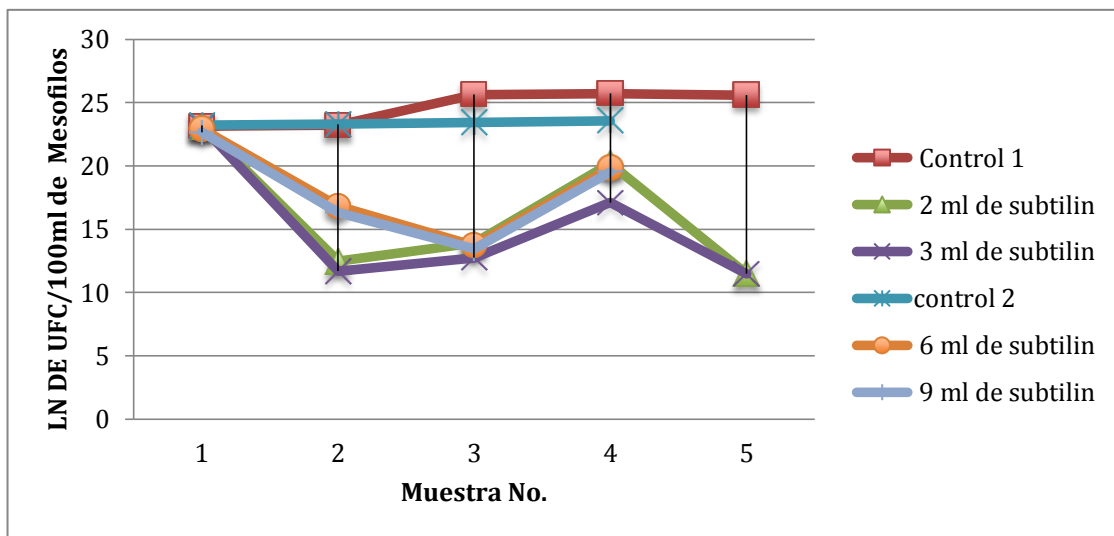


Figura 5. Tendencia poblacional de Mesófilos (LN) para los diferentes tratamientos (dosificaciones de Subtilin) con dos controles negativos, sin adición del producto.

En el gráfico de mesófilos con respecto al tiempo en los ensayos en blanco y con Subtilin se encuentra que efectivamente el Subtilin tiene incidencia sobre el número de unidades formadoras de colonias de mesófilos presente en la muestra, sin embargo se observa que con las adiciones de 2 y 3 ml se da un descenso inicial mayor que con 6 y 9 ml, lo que muestra que no hace vale la

pena agregar el Subtilin en cantidades mayores a los 3 ml, pues es esta concentración la que da un mejor resultado disminuyendo en mayor medida la presencia de mesófilos.

Finalmente, los mesófilos cuentan con poblaciones mayores con relación a los demás parámetros mencionados anteriormente, probablemente a razón de adecuadas condiciones de temperatura, ya que dichos microorganismos caracterizan por tener un mejor crecimiento entre los 20°C y 45°C (Stanier, 1992).

13. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- Se obtuvo una alternativa de bioremediación que permite que estas aguas mejoren en su calidad microbiológica, en consideración de la capacidad de depuración de este sistema acuático a causa de esta alta carga de agua residuales domésticas, dado principalmente por el proceso de urbanización
- Los resultados obtenidos con el uso de microorganismo biorremediadores para mejorar las condiciones de las aguas domésticas generadas en las plantas de tratamiento de aguas residuales, son altamente satisfactorias, en especial en lo referente a la reducción de Coliformes fecales y *Escherichia coli*.
- Se demostró la alta eficiencia del *B Subtilis* al mejorar las condiciones de las muestras de PTARD, con porcentajes de reducción altamente satisfactorios, en cuanto a coliformes totales, fecales y *E. coli*.
- El objetivo de reducir y/o eliminar olores ofensivos fue igualmente alcanzado, en una escala de 0 a 5, supone una intensidad sin olor en donde el tratamiento de 3 ml fue el que tuvo mejor comportamiento
- El comportamiento en la reducción de Coliformes Fecales y *Escherichia coli* con el paso del tiempo en el desarrollo de las pruebas permite predecir que en una o dos semanas más, es posible la eliminación total de estos patógenos, ya que se tiene una disminución monótona de la presencia de estos.
- De acuerdo con las observaciones de los experimentos, la cantidad más adecuada a adicionar de Subtilin al agua es de 3 ml, puesto que se obtuvieron igual o mejores resultados que con las demás concentraciones en tiempos iguales o menores.

- Es preciso realizar una prueba para determinar el efecto que tiene la adición de Subtilin sobre el contenido o viabilidad de huevos de Helminto, ya que si bien el estudio de estos parásitos no es generalizado en microbiología, si resulta de gran importancia en el tratamiento de aguas residuales, ya que estos huevos constituyen una etapa contagiosa de los parásitos de Helminto y son principalmente problemáticos porque son capaces de resistir tensiones ambientales y algunas veces la desinfección con cloro en la planta de tratamiento.
- Los avances que se han tenido con la evaluación de la efectividad del Subtilin resultan de gran importancia para el tema del tratamiento de aguas residuales, y por lo tanto representa una opción para contribuir a la solución de diferentes problemas de salud pública, impactado positivamente la calidad de vida de la comunidad.

10. REFERENCIAS

- Biocontrol. Febrero 2012. Informe y Evaluación de resultados de la prueba realizada por el laboratorio Biocontrol para la bioremediación de los biosólidos generados en la PTAR “El Salitre” de la ciudad de Bogotá D.C. Juan Manuel Reyes Navia I.A., Asesor Técnico y Comercial, Biocontrol.
- Cardona Gómez Juanita, García Luisa Alejandra, Diciembre 2008. Evaluación del efecto de los microorganismos eficaces sobre la calidad de un agua residual doméstica. Tesis para optar por el título de pregrado de Microbiología industrial. Universidad Javeriana, Facultad de Ciencia. Bogotá D.C.
- Das Gitishree, Prasad M.P. April 2010. Isolation, purification & mass production of protease enzyme from *Bacillus Subtilis*. *International Research Journals of microbiology Vol. 1(2) pp. 026-031*, 1-5.
- Gutiérrez Latorre Monserrat, 2008. *Obtención y caracterización bioquímica de un enzima de resistencia a antibióticos aminoglicosidos: 6-Adeniltransferas de “Bacillus Subtilis”* Tesis para optar al título de doctor. Universidad Complutense de Madrid Facultad de ciencias biológicas. Madrid.
- Harikrishna Yadav Nanganuru, Korrapati Narasimhulu, Prakash M. Bhanu. Mayo 2010. Studies on the potential of *Bacillus Subtilis* in the Biodegradation of Engine oil. *Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences Vol. 2 N°3*, 2-3.
- Rodier Jean. (2009). Análisis del agua. Ediciones Omega. Novena edición. Barcelona.
- Romero J. (2009). Calidad del agua. Editorial Escuela Colombiana de Ingeniería. Tercera edición. Bogotá.
- Sampieri Hernández R, Collado Fernández Carlos, Baptista Lucio Pilar. 2006. Capítulo 5 Definición del alcance de la investigación a realizar: exploratoria, descriptiva, correlacional o explicativa. Metodología de la Investigación. México. Mc Graw Hill.
- La membrana de *B. Subtilis*.....(Johnson *et al.*, 2004) “copiado textualmente” (Romero, 2009)
- Según Sampieri y colaboradores (2006)
- Johnson A.S., Horck S. Van. 2004. Dynamic localization of membrane proteins in *Bacillus Subtilis*. *Microbiology*. Recuperado el día de mes de año de la URL: <http://mic.sgmjournals.org/content/150/9/2815.full>. 68

- IDEA- UNAL, Instituto de Estudios Ambientales - Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. 2008. Problemática, valoración y evaluación DE IMPACTOS AMBIENTALES.
- Sanchez Humberto, Alonso Juan C. 2005. Bacillus Subtilis RecN binds and protects 3'-single-stranded DNA extensions in the presence of ATP. *Oxford Journals*, Vol. 33. Recuperado de <http://nar.oxfordjournals.org/content/33/7/2343.full>.
- Sylvia Zavala Trías, MLS. 2012. Guía de la redacción en el estilo APA, 6ª Edición. Recuperado de <http://www.suagm.edu/umet/biblioteca/pdf/GuiaRevMarzo2012APA6taEd.pdf>.
- Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, octubre de 2008. *Plan de Manejo Ambiental del Humedal El Burro, Problemática, Valoración y Evaluación*. Recuperación de <http://ambientebogota.gov.co/documents/10157/e46cb072-0bdd-4276-a5d3-ba71f2d74469>.
- APHA-AWWA-WEF (2005) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21th Edition. New York, 9 -153, 154 y 158, método 9610D.
- SCHARLAU (2006) Handbook of Microbiological Media. Edition No. 9, Barcelona, pág. 99

ANEXOS I: REPORTES DE RESULTADOS DE PARAMETROS MICROBIOLÓGICOS Y FISICOQUÍMICOS.

ANEXOS II: MANUAL DE PROCEDIMIENTO MUESTREO DE AGUA.

ANEXOS III: FICHA TÉCNICA SUBTILIN, BIOCONTROL.

