



*Evaluación de la remoción de Demanda Química y Bioquímica de Oxígeno de
lixiviados mediante bacterias rizosféricas de Typha domingensis*

*Evaluation of the removal of Chemical and Biochemical Oxygen Demand from
leachates by means of rhizospheric bacteria of Typha domingensis*

*Avaliação da remoção da Demanda Química e Bioquímica de Oxigênio de
lixiviados por meio de bactérias rizosféricas de Typha domingensis*

Juan Carlos González-García ^I
juan.gonzalez@esPOCH.edu.ec
<https://orcid.org/0000-0001-9066-1600>

Jenny Karol Barragán Guerrero ^{II}
jenny.barragan@esPOCH.edu.ec
<https://orcid.org/0000-0001-9197-4369>

Ana María Cunachi-Pillajo ^{III}
amcunachip@esPOCH.edu.ec
<https://orcid.org/0000-0001-6391-3489>

Sofía Carolina Godoy-Ponce ^{IV}
sofia.godoy@esPOCH.edu.ec
<https://orcid.org/0000-0002-6479-4343>

Correspondencia: juan.gonzalez@esPOCH.edu.ec

Ciencias Técnicas y Aplicadas
Artículo de Investigación

* **Recibido:** 23 de mayo de 2022 * **Aceptado:** 12 de junio de 2022 * **Publicado:** 29 de julio de 2022

- I. Magíster en Ingeniería Química Aplicada de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Investigadora de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador.
- II. Magíster en Ingeniería Química Aplicada de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Ecuador, Investigadora de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador
- III. Magíster Scientiarum Mención Microbiología del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Venezuela, Técnico Docente e Investigadora de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador.
- IV. Máster Universitario en Gestión Ambiental y Energética en las Organizaciones de la Universidad Internacional de la Rioja, España, Profesora a Tiempo Completo de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador.

Resumen

Se ensayó con consorcios microbianos obtenidos de las raíces de totora procedentes de un humedal artificial de un relleno sanitario (H_1) y su sedimento (S_1), así como, del agua (H_2) y sedimento (S_2) de una laguna natural (I), y del agua (H_3) y sedimento (S_3) de una laguna natural (II). Se bioaumentaron las muestras y se agruparon para formar siete consorcios microbianos en ensayos desde E1 hasta E7. Posteriormente se pusieron en contacto con el lixiviado y se analizó la Demanda Química de Oxígeno-DQO (método APHA 5220-D) y la Demanda Bioquímica de Oxígeno-DBO₅ (método APHA 5210-B) en tres períodos diferentes: 15, 30 y 45 días; con los resultados obtenidos se aplicó un análisis de varianza tomando como factores a los 7 ensayos y los 3 períodos, evidenciándose que el consorcio microbiano más eficiente en la remoción de la Demanda Química de Oxígeno es el E2 con un porcentaje de remoción alrededor del 88% y para la Demanda Bioquímica de Oxígeno es el E4 con cerca de 81%. También se calculó el consumo de los microorganismos del humedal artificial para reducir la Demanda Química de Oxígeno tanto para el invierno como para el verano eran similares de aproximadamente de 223 Kg/día; y para la reducción del Demanda Bioquímica de Oxígeno el consumo de microorganismos es cercano a 16 Kg/día durante el invierno como para el verano.

Palabras clave: Microorganismos rizosféricos; totora; demanda química de oxígeno; demanda bioquímica de oxígeno; consorcio microbiano; tratamiento de lixiviado.

Abstract

It was tested with microbial consortia obtained from totora roots from an artificial wetland of a sanitary landfill (H_1) and its sediment (S_1), as well as from water (H_2) and sediment (S_2) from a natural lagoon (I), and the water (H_3) and sediment (S_3) of a natural lagoon (II). Samples were bioaugmented and pooled to form seven microbial consortia in assays E1 through E7. Subsequently, they were put in contact with the leachate and the Chemical Oxygen Demand-COD (APHA 5220-D method) and the Biochemical Oxygen Demand-BOD₅ (APHA 5210-B method) were analyzed in three different periods: 15, 30 and 45 days; With the results obtained, an analysis of variance was applied, taking as factors the 7 trials and the 3 periods, showing that the most efficient microbial consortium in the removal of the Chemical Oxygen Demand is E2 with a removal percentage of around 88%. and for Biochemical Oxygen Demand it is E4 with about 81%. The consumption of the artificial wetland microorganisms was also calculated to reduce the

Chemical Oxygen Demand for both winter and summer, they were similar at approximately 223 Kg/day; and for the reduction of the Biochemical Oxygen Demand, the consumption of microorganisms is close to 16 Kg/day during the winter as for the summer.

Keywords: Rhizospheric microorganisms; totora; chemical oxygen demand; biochemical oxygen demand; microbial consortium; leachate treatment.

Resumo

Foi testado com consórcios microbianos obtidos de raízes de totora de um pântano artificial de um aterro (H1) e seu sedimento (S1), bem como de água (H2) e sedimento (S2) de uma lagoa natural (I), e a água (H3) e o sedimento (S3) de uma lagoa natural (II). As amostras foram bioaumentadas e agrupadas para formar sete consórcios microbianos nos ensaios E1 a E7. Posteriormente, foram colocados em contato com o lixiviado e a Demanda Química de Oxigênio-DQO (método APHA 5220-D) e a Demanda Bioquímica de Oxigênio-DBO5 (método APHA 5210-B) foram analisadas em três períodos distintos: 15, 30 e 45 dias; Com os resultados obtidos, foi aplicada uma análise de variância, tomando como fatores os 7 ensaios e os 3 períodos, mostrando que o consórcio microbiano mais eficiente na remoção da Demanda Química de Oxigênio é o E2 com um percentual de remoção em torno de 88%. para Demanda Bioquímica de Oxigênio é E4 com cerca de 81%. Também foi calculado o consumo de microorganismos de áreas úmidas artificiais para reduzir a Demanda Química de Oxigênio tanto no inverno quanto no verão, que foram semelhantes em aproximadamente 223 Kg/dia; e para a redução da Demanda Bioquímica de Oxigênio, o consumo de microorganismos é próximo a 16 Kg/dia tanto no inverno quanto no verão.

Palavras-chave: Microorganismos da rizosfera; taboa; demanda de oxigênio químico; Demanda de oxigênio bioquímico; consórcio microbiano; tratamento do lixiviado.

Introducción

El crecimiento poblacional en las ciudades ha incrementado la generación de desechos sólidos y también su acumulación en lugares de disposición final como los rellenos sanitarios municipales donde los procesos de transformación y transporte de la materia generan lixiviados. (Liu & Wang, 2020).

Estos líquidos provienen de reacciones de diferentes tipos tales como: químicas, bioquímicas y contienen grandes cantidades de sustancias orgánicas compuesta por elementos como azúcares, proteínas, aminoácidos y ácidos grasos. (Yang et al., 2019).

Los lixiviados por su naturaleza provocan impactos ambientales adversos que dañan los sistemas naturales, en especial, suelo y agua. (Salgado Bernal et al., 2012).

El relleno sanitario de Baños (Tungurahua-Ecuador) cuenta con una planta de tratamiento de lixiviados con un humedal artificial poblado de *Typha dominguensis* conocida popularmente como totora que no cumple de manera efectiva con su función depuradora. Dicha planta cuenta con un reactor anaerobio de flujo ascendente que reduce la carga orgánica entre 40 a 50%, y el humedal artificial complementa el proceso, el efluente después de ser tratado por el reactor es vertido con valores altos de la Demanda Química de Oxígeno-DQO y Demanda Bioquímica de Oxígeno-DBO. (Ministerio del Ambiente & Saneamiento Ambiental, 2017).

Para mejorar el desempeño de humedales artificiales generalmente se agregan cocteles bacterianos comerciales como “Micropan ALFA POBs” que son polvos bioactivadores para remediar lixiviados con altos niveles de compuestos orgánicos difíciles de degradar.

Tomando en cuenta los altos costos de los productos comerciales usados como bioactivadores para remediar lixiviados, y la necesidad de mejorar el desempeño del humedal utilizando microorganismos rizosféricas obtenidos de las plantas de totora se disminuirá la demanda química y bioquímica de oxígeno del lixiviado para ser vertido al ambiente de manera segura.

De acuerdo a Salgado Bernal et al., 2012, caracterizaron 58 cepas bacterianas extraídas de la rizosfera de plantas hidrófitas para la remoción de materia orgánica de aguas residuales, donde trece cepas aisladas demostraron una remoción de DQO y DBO₅ sobre el 50 % de un efluente complejo en 72 horas. Las cepas estudiadas contribuyeron a la remediación de efluentes al disminuir la materia orgánica.

Mawang et al., en 2021, describen las actinobacterias como potenciales degradadoras de contaminantes por su distribución cosmopolita en los sedimentos de plantas macrófitas. Estas bacterias degradan polímeros complejos, promueven el reciclaje de compuestos y la producción de moléculas bioactivas. Mediante Bioaumentación, la capacidad de degradación de las áreas contaminadas se puede mejorar con la introducción de microorganismos específicos. (Cheng et al., 2021)

J. Quintero, 2014 obtuvo un porcentaje de remoción de DBO_5 de 87,7% en un humedal de flujo subsuperficial usando *Heliconia Psittacorum*, y un porcentaje de remoción de DBO_5 de 90,8% del humedal de flujo superficial usando *Lenma minor*, logrando una alta eficiencia en la remoción de materia orgánica de aguas residuales.

Materiales y Métodos

Toma de muestras

Se tomó muestras de *Typha dominguensis* del humedal artificial de un relleno sanitario (H_1) y su sedimento (S_1); del agua (H_2) y sedimento (S_2) de una laguna natural (I), y del agua (H_3) y sedimento (S_3) de una laguna natural (II).

Inoculación de microorganismos procedentes de muestras

Se preparó los medios, agar MacConkey (AMC), agar Papa Dextrosa (PDA) y agar Nutritivo (AN): 50g de AMC + 1l agua destilada; 39g de PDA + 1l agua destilada; 23g de AN + 1l agua destilada.

Preparación de diluciones

- 60 ml de agua peptonada al 1% con agua destilada estéril y reposada 24 horas.
- Se enriqueció las 6 muestras H_1 , H_2 , H_3 , S_1 , S_2 y S_3 , en botellas, 90 ml cada muestra con 10 ml de solución peptonada al 1%.
- Se preparó diluciones, donde 10^{-1} es la muestra enriquecida.
- Para las siguientes diluciones, en tubo de ensayo se agrega 9 ml de agua destilada estéril + 1000 μ l de la dilución anterior, para obtenerla siguiente dilución 10^{-2} y así sucesivamente hasta llegar a 10^{-5}

Inoculación de diluciones

- En cajas Petri con AMC, PDA y AN sólido se vertió 500 μ l de las diluciones de cada muestra sobre la superficie del agar.
- Se incubaron a una temperatura de 12 - 15 °C similar a la que los microorganismos viven en el humedal artificial por 24 horas.

Determinación Unidades Formadoras de Colonias

- Se determinó las unidades formadoras de colonias (UFC) de las diluciones 10-5 por cada agar, permitió el recuento de células visibles.

$$\frac{UFC}{ml} = \frac{Volumen\ inoculado\ de\ la\ dilución\ (ml)}{Volumen\ total\ (ml)}$$

- Se descartó diluciones de muestras en AN ya que sobrepasaron las 300 colonias y no garantizan un UFC/ml confiable.

Bioaumentación

- Se realizó en cámara de aislamiento y flameo con mechero, se tomó una cantidad de masa de microorganismos de las colonias anteriormente inoculadas con características diferentes de acuerdo a la morfología de las colonias de bacterias, hongos y levaduras de las muestras H₁, H₂, H₃, S₁, S₂, S₃, y se inocularon en zigzag sobre el medio de cultivo solidificado con el mismo agar del cual provienen y se obtuvieron microorganismos puros. Se codificó con letras del alfabeto

Ensayos realizados

- Se tomó una cantidad de masa de microorganismos de las cajas Petri y se disgregó en 18 ml de agua destilada estéril.

Figura 1: Ensayos experimentales

Tratamiento	Composición de los consorcios paracada tratamiento
E1	Enterobacterias cajas: a hasta l , y diluciones 10 ⁻¹ a 10 ⁻⁸ de muestra 2 (AMC). (Muestras de 1 a 28)
E2	Levaduras caja (Muestra 32)
E3	Hongos cajas: ll , o , p , w (Muestra 29, 30, 31, 37)
E4	Consortio 4 ml de ensayos E2, E3, y otras bacterias, en proporción 1:1:1

E5	Consortio con 4 mL de ensayos E1, E2, E3 en proporción 1:1:1
E6	Consortio con 4 mL de ensayos E1, E2, y otras bacterias, en proporción 1:1:1
E7	Tratamiento control con lixiviado

Para los experimentos, se agregó 2 ml de consorcio/200 ml de lixiviado. Se utilizó 600 ml de volumen de lixiviado/consorcio por fecha de análisis de DQO y DBO₅. Los 600 ml se distribuyeron en 3 recipientes de 200 ml, obteniéndose 3 por cada fecha de análisis (9 en total).

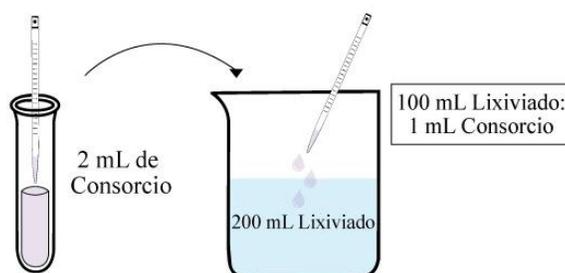


Figura 2: Unidades experimentales

Se estableció tres períodos (15, 30 y 35 días) para el análisis de DQO y DBO₅ de los 7 ensayos.

Determinación concentración microbiana/consorcio de cada ensayo

La concentración inicial UFC/ml lixiviado, presente en los consorcios microbianos se contó (cámara de recuento Neubauer) los microorganismos en suspensión de los diferentes tratamientos bajo el microscopio 100X.

Recuento microscópico:

$$\frac{UFC}{ml} = \frac{\text{Volumen suspensión celular}}{\text{cámara Neubauer a } 0,1 \text{ mm } (10^4)} \cdot \frac{\text{Volumen total dilución (ml)}}{1}$$

Unidades formadoras de colonias por recuento microscópico

Macro y Micro Morfología

- Por tinción Gram, se tomó en cuenta el microorganismo: bacteria, hongo o levadura presente en los medios AMC, PDA.

Prueba de Catalasa en bacterias

- Se colocó una pequeña cantidad de masa microbiana por placa, se agregó una gota de peróxido de hidrógeno, el desprendimiento de oxígeno se elimina en forma de efervescencia es indicativo de Catalasa positiva.

Porcentaje de remoción de Demanda Química Oxígeno y Demanda Bioquímica Oxígeno.

Se tomó los promedios de repeticiones de todos los ensayos analizados a los 15 y a los 45 días de la investigación.

$$E = \frac{DQO_i - DQO_f}{DQO_i}$$

E: Eficiencia de remoción de DQO, (%)

DQO_i: DQO analizada a los 15 días (mg /L)

DQO_f: DQO analizada a los 45 días (mg /L)

La misma ecuación se aplicó para el DBO₅.

Análisis estadístico

- Se aplicó un tipo modelo experimental factorial mixto con un diseño completamente al azar (DCA), tomando en cuenta 2 factores: Factor 1: Composición consorcio microbiano (7 grupos: E1 a E7), intersujetos. Factor 2: Tiempo transcurrido, consorcio microbiano en contacto con el lixiviado (15, 30 y 45 días de contacto), intrasujetos.
- Variables aleatorias: DQO y DBO₅.
- Unidades experimentales: 7
- Muestras por unidad experimental: 3
- Total, de muestras: 21
- ANOVA con dos factores diseño mixto a los datos de DQO y DBO₅, como factores a los

siete tipos de ensayos y los tres tiempos transcurridos.

- Se supone distribución normal de datos (Shapiro-Wilk) y homogeneidad de varianzas (Levene y Mauchly). Para todas las pruebas se toma un nivel de significancia menor a 0,05.
- Adicionalmente se analizó medias de las diferentes condiciones a través de ajustes Post-Hoc de los efectos principales con Bonferroni; para identificar en donde se concentran las diferencias significativas a través de subgrupos homogéneos, interesa detectar los tratamientos significativamente mejores que el ensayo control E7

Resultados y Discusión

Resultados iniciales de Demanda Química de Oxígeno y de Demanda Bioquímica de Oxígeno:

Figura 3: Resultados iniciales, DQO y DBO₅

Parámetros	Métodos	Muestra (mg/l)	1Muestra (mg/l)	2Muestra (mg/l)	3
DQO	APHA 5220-3780,0 D		54,0	50,0	
DBO ₅	APHA 5210-3000,0 B		11,8	11,0	

La Tabla 2 muestra los resultados iniciales realizados a las muestras 1, 2 y 3 evidenciándose los parámetros problemáticos de DQO y DBO₅.

Resultados de medición de pH y Temperatura en muestras

Figura 4: Resultados pH y Temperatura

Muestra	pH	Temperatura(°C)
Agua destilada	6,6	12,0
H ₁	8,8	12,2

H ₂	9,6	12,5
H ₃	8,0	13,4
S ₁	8,8	17,3
S ₂	9,1	17,9
S ₃	7,4	18,9

En la Tabla 3 se observan los resultados de pH y temperatura de las muestras iniciales útiles para replicar el ambiente de su procedencia en laboratorio.

Resultados Determinación de Unidades Formadoras de Colonias (UFC)

En la Tabla 4 se muestra el resultado del conteo de UFC de las muestras inoculadas en dilución 10⁻⁵ en agar AMC, PDA y AN

Figura 5: Resultados Unidades Formadoras de Colonias

Muestra	UFC/ml		
	AMC	PDA	AN
H ₁	210000	40000	1150000,0
H ₂	5000	155000	-
H ₃	820000	140000	-
S ₁	50000	255000	500000,0
S ₂	440000	345000	-
S ₃	385000	350000	-

Se evidencia gran presencia de UFC por tanto, permitió su aislamiento y magnificación. Los microorganismos inoculados en AN no se utilizaron para el proceso de Bioaumentación

Resultados Bioaumentación de colonias

Conteo de las UFC Bioaumentadas en agar AMC.

Figura 6: Unidades Formadoras de Colonias en AMC

Muestra	Dilución	Cajas	UFC/ml
Bioaumentadas			
H ₁	10 ⁻⁵	a	175x10 ³
H ₁	10 ⁻⁵	b	285 x10 ³
H ₁	10 ⁻⁵	c	245 x10 ³
S ₃	10 ⁻⁵	d	310 x10 ³
S ₃	10 ⁻⁵	e	345 x10 ³
S ₃	10 ⁻⁵	f	415 x10 ³
H ₂	10 ⁻⁵	g	835 x10 ³
H ₂	10 ⁻⁵	h	670 x10 ³
S ₁	10 ⁻⁵	i	55 x10 ³
S ₁	10 ⁻⁵	j	105 x10 ³
H ₃	10 ⁻⁵	k	900 x10 ³
H ₃	10 ⁻⁵	l	730 x10 ³

Conteo de las UFC Bioaumentadas en agar PDA, Las cajas Petri ll, u, v, y, revelaron contaminación, se volvieron a inocular con la misma nomenclatura, ll1, ll2, u1, u2, v1, v2, y1, y2, y se incluyen en la Tabla 6.

Figura 7: Unidades Formadoras de Colonias en PDA

Muestra	Dilución	Cajas	UFC/ml
bioaumentadas			
H ₁	10 ⁻¹	ll1	1300
H ₁	10 ⁻¹	ll2	600
H ₁	10 ⁻¹	o	1150
H ₂	10 ⁻¹	p	50
H ₃	10 ⁻¹	q	250
H ₃	10 ⁻¹	r	50

H ₃	10 ⁻¹	s	50
H ₃	10 ⁻²	t	500
S ₁	10 ⁻¹	u1	6150
S ₁	10 ⁻¹	u2	10000
S ₁	10 ⁻¹	u1	6150
S ₁	10 ⁻¹	u2	10000
S ₂	10 ⁻¹	v1	7650
S ₂	10 ⁻¹	v2	7400
S ₃	10 ⁻¹	w	50
S ₃	10 ⁻³	x	1600
H ₂	10 ⁻¹	y1	250
H ₂	10 ⁻¹	y2	350

Resultados concentración microbiana en consorcios por ensayo

Figura 8: Concentración microbiana por ensayo

Ensayo	Concentración consorcios (UFC/ml)
E1	7292812,50
E2	2328000,00
E3	301000,00
E4	3553125,00
E5	2475250,00
E6	3660000,00
E7	2751000,00
Otras	4951000,00

Figura 9: Clasificación microorganismos utilizadas en ensayos

Muestra	Dilución	Medio	Cajas aisladas	Código (-20 °C)	Bacteria	Hongo	Levadura	Otro
----------------	-----------------	--------------	---------------------------	----------------------------	-----------------	--------------	-----------------	-------------

H ₁	10 ⁻⁵	AMC	a	1	x
H ₁	10 ⁻⁵	AMC	b	2	x
H ₁	10 ⁻⁵	AMC	c	3	x
S ₃	10 ⁻⁵	AMC	d	4	x
S ₃	10 ⁻⁵	AMC	e	5	x
S ₃	10 ⁻⁵	AMC	f	6	x
H ₂	10 ⁻⁵	AMC	g	7	x
H ₂	10 ⁻⁵	AMC	h	8	x
S ₁	10 ⁻⁵	AMC	i	9	x
S ₁	10 ⁻⁵	AMC	j	10	x
H ₃	10 ⁻⁵	AMC	k	11	x
H ₃	10 ⁻⁵	AMC	l	12	x
H ₂	10 ⁻¹	AMC	-	13	x
H ₂	10 ⁻²	AMC	-	14	x
H ₂	10 ⁻³	AMC	-	15	x
H ₂	10 ⁻⁴	AMC	-	16	x
H ₂	10 ⁻⁵	AMC	-	17	x
H ₂	10 ⁻⁶	AMC	-	18	x
H ₂	10 ⁻⁷	AMC	-	19	x
H ₂	10 ⁻⁸	AMC	-	20	x
H ₂	10 ⁻¹	AN	-	21	
H ₂	10 ⁻²	AN	-	22	
H ₂	10 ⁻³	AN	-	23	
H ₂	10 ⁻⁴	AN	-	24	
H ₂	10 ⁻⁵	AN	-	25	
H ₂	10 ⁻⁶	AN	-	26	
H ₂	10 ⁻⁷	AN	-	27	
H ₂	10 ⁻⁸	AN	-	28	
H ₁	10 ⁻¹	PDA	lll	29	x
H ₁	10 ⁻¹	PDA	o	30	x
H ₂	10 ⁻¹	PDA	p	31	x
H ₃	10 ⁻¹	PDA	q	32	x
H ₃	10 ⁻¹	PDA	r	33	x
H ₃	10 ⁻¹	PDA	s	34	x
H ₃	10 ⁻²	PDA	t	35	x

H ₃	10 ⁻¹	PDA	v2	36	x
S ₃	10 ⁻¹	PDA	w	37	x
S ₃	10 ⁻³	PDA	x	38	x
H ₂	10 ⁻¹	PDA	y2	39	x
H ₂	10 ⁻¹	PDA	-	40	x
H ₂	10 ⁻²	PDA	-	41	x
H ₂	10 ⁻³	PDA	-	42	x
H ₂	10 ⁻⁴	PDA	-	43	x
H ₂	10 ⁻⁵	PDA	-	44	x
H ₂	10 ⁻⁶	PDA	-	45	x
H ₂	10 ⁻⁷	PDA	-	46	x
H ₂	10 ⁻⁸	PDA	-	47	x

En la Tabla 8, se codificó las muestras para congelación a -20°C, se utilizó la codificación arábica. Se clasificó los microorganismos utilizados en los tratamientos por caja progenitora en: bacteria, hongos y levaduras. Las muestras desde la 21 a la 28 se almacenaron, por esa razón tienen un código, cabe recalcar que no se utilizaron en los tratamientos. La muestra 34 está en la columna “otros” fue identificada como Actinobacterias, estas son importantes en la descomposición quitina y celulosa, se evidencia la abundancia microbiana en las muestras tal como lo publicó Salgado Bernal et al., en 2012.

Figura 10: Morfología macro y microscópica, clasificación de microorganismos

Muestra	Macro morfología	Micro morfología	Tinción Gram	Microorganismo
1	I-O-A-S-E	B	-	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Salmonella Abony</i> DSM 4224 • <i>Salmonella Typhimurium</i> ATCC 14028
2	I-O-R-S-E	B	-	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Enterobacter, Klebsiella</i> • <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 • <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 • <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 • <i>Salmonella, Shigella</i>
3	I-O-R-S-E	B	-	<ul style="list-style-type: none"> • <i>E. Coli</i> • <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 • <i>Pseudomonas</i> • <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212

				<ul style="list-style-type: none"> • <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923
4	I-O-R-S-E	B	-	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Salmonella</i> Abony DSM 4224 • <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028 • <i>Salmonella</i>, <i>Shigella</i>
5	I-O-A-E	B	-	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Salmonella</i> Abony DSM 4224 • <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028 • <i>Salmonella</i>, <i>Shigella</i>
6	P-O-A-E	B	-	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Salmonella</i>, <i>Shigella</i> • <i>Salmonella</i> Abony DSM 4224 • <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028
7	P-O-A-E	B	-	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Salmonella</i> Abony DSM 4224 • <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028 • <i>Salmonella</i>, <i>Shigella</i>
8	R-O-A-S-E	B	-	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Salmonella</i> Abony DSM 4224 • <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028 • <i>Salmonella</i>, <i>Shigella</i>
9	R-O-S-E	B	-	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 • <i>Salmonella</i>, <i>Shigella</i> • <i>Salmonella</i> Abony DSM 4224 • <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028
10	I-O-A-E	B	-	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Enterobacter</i>, <i>Klebsiella</i> • <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 • <i>Salmonella</i>, <i>Shigella</i>
11	I-O-S-R-E	B	-	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Salmonella</i> Abony DSM 4224 • <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028 • <i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12453 • <i>Salmonella</i>, <i>Shigella</i>
12	I-O-S-R-E	B	-	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Salmonella</i> Abony DSM 4224 • <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028 • <i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12453 • <i>Salmonella</i>, <i>Shigella</i>
13	P-O-A-E	B	-	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Enterobacter</i>, <i>Klebsiella</i> • <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 • <i>Salmonella</i>, <i>Shigella</i>

14	P-O-A-E	C-B	-	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Enterobacter, Klebsiella</i> • <i>Escherichia coli ATCC 25922</i> • <i>Salmonella, Shigella</i>
15	P-O-A-E	B	-	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Enterobacter, Klebsiella</i> • <i>Escherichia coli ATCC 25922</i> • <i>Salmonella, Shigella</i>
16	P-O-A-E	B	-	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Enterobacter, Klebsiella</i> • <i>Escherichia coli ATCC 25922</i> • <i>Salmonella, Shigella</i>
17	P-O-A-E	B	-	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Enterobacter, Klebsiella</i> • <i>Escherichia coli ATCC 25922</i> • <i>Salmonella, Shigella</i>
18	P-O-A-E	B	-	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Enterobacter, Klebsiella</i> • <i>Escherichia coli ATCC 25922</i> • <i>Salmonella, Shigella</i>
19	P-O-A-E	B	-	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Enterobacter, Klebsiella</i> • <i>Escherichia coli ATCC 25922</i> • <i>Salmonella, Shigella</i>
20	P-O-A-E	B	-	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Enterobacter, Klebsiella</i> • <i>Escherichia coli ATCC 25922</i> • <i>Salmonella, Shigella</i>
29	C-I-O-A-E	H	+	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Hongo Filamantoso Penillicillum sp.</i>
30	C-I-O-A-E	H	+	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Hongo Filamantoso</i> • <i>Fusarium sp.</i>
31	C-I-O-A-E	H	+	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Hongo Filamantoso Penillicillum sp.</i>
32	I-O-S-R-Co	L	+	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Rhodotorula mucilaginosa.</i>
33	I-O-S-R-Co	C	+	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Exophiala</i>
34	R-O-A-E	C	+	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Exophiala</i>
35	I-O-S-R-Co	C	+	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Exophiala</i>
36	Ri-O-S-R	C	+	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Aspergillus sp1</i>
37	C-I-O-A-E	H	+	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Trichoderma sp Trichosporon asteroides</i>
38	Ri-O-S-U	C	+	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Trichosporon asteroides</i>
39	Ri-O-S-Co	C	+	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Bacillus subtilis</i>
40	G-Co-L	C	+	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Trichosporon asteroides</i>
41	P-O-S-E	C	+	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Trichosporon asteroides</i>
42	P-O-S-E	C	+	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Bacillus subtilis</i>

43	P-O-S-E	C	+	• <i>Trichosporon asteroides</i>
44	P-O-S-E	C	+	• <i>Bacillus subtilis</i>
45	P-O-S-E	C	+	• <i>Bacillus subtilis</i>
46	P-O-S-E	C	+	• <i>Trichosporon asteroides</i>
47	P-O-S-E	C	+	• <i>Trichosporon asteroides</i>
Macromorfología: Irregular (I), Ondular (O), Áspero (A), Suave (S), Elevado (E), Reluciente (R), Rizoide (Ri), Puntiforme (P), Granular (G), Lobulada (L), Circular (C), Convexa (Co); Umbonado (U).				
Micromorfología: Bacilo (B), Coco (C), Hongo (H), Levadura (L)				

La Tabla 9 describe la morfología macroscópica o de colonia y la morfología microscópica, así como, la tinción de Gram de cada muestra. Se describen los posibles microorganismos presentes en cada muestra. Se evidencia el predominio de bacterias en las muestras generalmente de formas irregulares, puntiformes y ondulares, similares a encontradas en sedimentos de lagunas naturales. Las muestras de la 21 a la 28 no se tomaron en cuenta para los tratamientos, por lo que, no se analizan y no se incluyen en la tabla

Resultados de remoción de DQO y DBO₅

Figura 11: Remoción de Demanda Química y Bioquímica Oxígeno a 15 días

Ensayo	DQO mg/L lixiviado			DBO ₅ mg/L lixiviado		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3
E1	6275,0	6345,0	6187,0	320,0	305,0	332,0
E2	6220,0	5980,0	5863,0	295,0	265,0	301,0
E3	5665,0	5862,0	5485,0	285,0	320,0	288,0
E4	5860,0	5671,0	5911,0	280,0	282,0	258,0
E5	5690,0	5548,0	5736,0	295,0	270,0	286,0
E6	5380,0	5671,0	5549,0	270,0	288,0	312,0
E7	5850,0	6130,0	5832,0	310,0	352,0	305,0

E1-E7= ensayos experimentales
R1, R2, R3= repeticiones

La Tabla 10 muestra los resultados de ensayos de remoción de DQO y DBO₅ analizados a los 15 días de iniciada la fase de contacto entre consorcios bacterianos y muestras de lixiviados del humedal artificial, los datos son la referencia de partida en la fase de ensayos de remoción.

Figura 12: Remoción de Demanda Química y Bioquímica Oxígeno a 30 días

Ensayo	DQO mg/l lixiviado			DBO ₅ mg/l lixiviado		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3
E1	2700,0	2841,0	2652,0	112,0	103,0	120,0
E2	2666,0	2475,0	2410,0	84,0	89,0	68,0
E3	2328,0	2185,0	2415,0	104,0	130,0	108,0
E4	2630,0	2688,0	2487,0	90,0	71,0	95,0
E5	2680,0	2510,0	2802,0	94,0	75,0	91,0
E6	2912,0	3223,0	3156,0	108,0	133,0	118,0
E7	2972,0	3117,0	2914,0	104,0	127,0	84,0

E1-E7= ensayos experimentales
R1, R2, R3= repeticiones

La Tabla 11 muestra los resultados de ensayos de remoción de DQO y DBO₅ medidos a los 30 días de iniciada la fase de contacto entre consorcios bacterianos y muestras de lixiviados del humedal artificial, si comparamos con la Tabla 10 es clara la reducción tanto en DQO como en DBO₅ convirtiéndose en un indicativo del proceso de remoción efectivo.

Figura 13: Remoción de Demanda Química y Bioquímica Oxígeno a 45 días

Ensayo	DQO mg/l lixiviado			DBO ₅ mg/l lixiviado		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3
E1	826,0	952,0	803,0	84,0	70,0	98,0
E2	838,0	690,0	679,0	76,00	82,00	62,00
E3	816,0	974,0	730,0	86,0	94,0	111,0
E4	804,0	749,0	817,0	56,00	62,00	42,00
E5	822,0	888,0	702,0	68,00	64,00	53,00
E6	1047,0	1133,0	1003,0	76,0	102,0	98,0

E7	928,0	903,0	1108,0	82,0	95,0	78,0
E1-E7 = ensayos experimentales						
R1, R2, R3 = repeticiones						

La Tabla 12 muestra resultados de ensayos de remoción de DQO y DBO₅ medidos a los 45 días de iniciada la fase de contacto entre consorcios bacterianos y muestras de lixiviados del humedal artificial, es decir al finalizar la etapa de ensayos de remoción, si comparamos con la Tabla 11 es clara la reducción tanto en DQO como en DBO₅ sin embargo el descenso de los parámetros controlados toma en los últimos 15 días una dinámica más lenta, pero sigue siendo efectiva.

Figura 14: Porcentaje de remoción

Ensayo	DQO (%)	DBO₅ (%)
E1	86,28	73,67
E2	87,78	74,45
E3	85,19	67,41
E4	86,41	80,49
E5	85,79	78,26
E6	80,83	68,28
E7	83,50	73,63

La Tabla 13 muestra los porcentajes de remoción de DQO y DBO₅ por tratamiento, los cuales fueron calculados en base los tiempos de ensayo y valores de la remoción medidos a los 15 y 45 días, tomando como referencia 30 días de período de experimentación. Siendo E2 el que mayor porcentaje de DQO removió y E4 el que mayor porcentaje de DBO removió.

Resultados análisis estadístico

DQO

Se presenta la tabla siguiente correspondiente al análisis de la varianza para identificar si existen diferencias significativas entre el tiempo transcurrido de contacto del consorcio microbiano con el lixiviado y la interacción entre el tiempo con el tratamiento.

Figura 15: Análisis de la varianza de DQO

Pruebas multivariante^a					
Efecto		Valor	F	gl	Significancia
Tiempo transcurrido	Traza de Pillai	0,996	1691,712 ^b	2,000	0,000
	Lambda de Wilks	0,004	1691,712 ^b	2,000	0,000
	Traza de Hotelling	260,263	1691,712 ^b	2,000	0,000
	Raíz mayor de Roy	260,263	1691,712 ^b	2,000	0,000
Tiempo transcurrido	Traza de Pillai	0,872	1,802	12,000	0,097
	Lambda de Wilks	0,306	1,753 ^b	12,000	0,112
Tratamiento	*Traza de Hotelling	1,692	1,692	12,000	0,132
	Raíz mayor de Roy	1,215	2,834 ^c	6,000	0,051
a. Diseño: Intersección + Tratamiento Diseño intrasujetos: Tiempo transcurrido					
b. Estadístico exacto					
c. El estadístico es un límite superior en F que genera un límite inferior en el nivel de significación.					

De acuerdo con la información de la tabla anterior, existen diferencias significativas entre el tiempo transcurrido de contacto del consorcio microbiano con el lixiviado y la interacción entre el tiempo con el tratamiento. Esto quiere decir que la optimización del humedal de la planta de tratamiento aplicando microorganismos rizosféricas de *Typha dominguensis* disminuyó la DQO del lixiviado. Comprobándose con pruebas de diferencias intrasujetos mostrada a continuación:

Figura 16: Diferencias intrasujetos, comparaciones por pareja

Comparaciones por parejas					
(I) tiempo transcurrido	(J) tiempo transcurrido	(I-J)	Sig. ^b	95% confianza para diferencia ^b	
				Límite inferior	Límite superior
15 días	30 días	3140,333 [*]	0,000	3052,242	3228,425
	45 días	4976,095 [*]	0,000	4892,887	5059,304
30 días	15 días	-3140,333 [*]	0,000	-3228,425	-3052,242
	45 días	1835,762 [*]	0,000	1735,366	1936,157

45 días	15 días	-4976,095*	0,000	-5059,304	-4892,887
	30 días	-1835,762*	0,000	-1936,157	-1735,366
Se basa en medias marginales estimadas					
*. La diferencia de medias es significativa en el nivel ,05.					
b. Ajuste para varias comparaciones: Bonferroni.					

Como se observa en la tabla anterior existen diferencias significativas entre el tiempo transcurrido de contacto del consorcio microbiano con el lixiviado (15, 30 y 45 días) para el parámetro DQO. Adicionalmente se aplicó la prueba de HSD Tukey para establecer los subconjuntos homogéneos a partir de los tratamientos:

Figura 17: Diferencias Intersujetos de la DQO

HSD Tukey ^{a,b}			
Ensayo	N	Subconjuntos homogéneos	
		1	2
E3	3	2940,00	
E5	3	3042,00	
E4	3	3068,56	
E2	3	3091,22	
E6	3		3230,44
E1	3		3286,78
E7	3		3306,00
Significancia		0,368	0,168
Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos. Se basa en las medias observadas.			
a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.			
b. Alfa = ,05.			

Según los resultados de la tabla 16, los ensayos E3, E5, E4 y E2 fueron significativamente mejores que los obtenidos para el tratamiento control (E7) con el lixiviado a temperatura ambiente para el DQO

DBO₅

Se presenta la tabla de análisis de la varianza para identificar si existen diferencias significativas de DBO₅ entre el tiempo transcurrido de contacto del consorcio microbiano con el lixiviado y la interacción entre el tiempo con el tratamiento.

Figura 18: Análisis de la varianza de DBO₅

Pruebas multivariante^a					
Efecto		Valor	F	gl	Significancia
Tiempo transcurrido	Traza de Pillai	0,996	1691,712 ^b	2	0
	Lambda de Wilks	0,004	1691,712 ^b	2	0
	Traza de Hotelling	260,263	1691,712 ^b	2	0
	Raíz mayor de Roy	260,263	1691,712 ^b	2	0
Tiempo transcurrido * Tratamiento	Traza de Pillai	0,872	1,802	12	0,097
	Lambda de Wilks	0,306	1,753 ^b	12	0,112
	Traza de Hotelling	1,692	1,692	12	0,132
	Raíz mayor de Roy	1,215	2,834 ^c	6	0,051
a. Diseño: Intersección + Tratamiento Diseño intrasujetos: Tiempo transcurrido					
b. Estadístico exacto					
c. El estadístico es un límite superior en F que genera un límite inferior en el nivel de significación.					

De acuerdo con la Tabla 17, existen diferencias significativas entre el tiempo transcurrido de contacto del consorcio microbiano con el lixiviado, pero no entre la interacción entre el tiempo con el tratamiento. Es decir, que la optimización del humedal de la planta de tratamiento aplicando microorganismos rizosféricas de *Typha dominguensis* disminuyó el DBO₅ del lixiviado. Estos resultados se comprueban mediante las pruebas de diferencias intrasujetos mostrada a continuación:

Como se observa en la tabla anterior existen diferencias significativas entre el tiempo transcurrido de contacto del consorcio microbiano con el lixiviado (15, 30 y 45 días) para el parámetro DBO₅. Adicionalmente se aplicó la prueba de HSD Tukey para establecer los subconjuntos homogéneos a partir de los tratamientos que obtuvieron resultados similares:

Según los resultados de la tabla anterior, los ensayos E4, E5 y E2 fueron significativamente mejores que los obtenidos para el tratamiento control con el lixiviado a temperatura ambiente (E7) para el parámetro DBO₅

Figura 19: Diferencias Intersujetos del DBO₅

HSD Tukey^{a,b}			
Ensayo	N	Subconjuntos homogéneos	
		1	2
E4	3	137,33	
E5	3	144,00	
E2	3	146,89	
E6	3		167,22
E3	3		169,56
E7	3		170,78
T1	3		171,56
Significancia		0,073	0,112
Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos. Se basa en las medias observadas.			
a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.			
b. Alfa = ,05			

Conclusiones

Se magnificó en laboratorio los microorganismos del agua y sedimento **de las raíces de plantas de *Typha dominguensis*** procedentes de un humedal artificial y de dos lagunas naturales en los medios AMC, PDA y AN, obteniéndose gran variedad de microorganismos como enterobacterias, hongos, levaduras y actinobacterias las cuales se separaron en consorcios puestos en contacto con lixiviados formando 6 ensayos más un ensayo testigo (sin consorcios) donde la actividad microbiana promovió la reducción de DQO y DBO₅.

Se evaluó la capacidad de los consorcios usados en los ensayos en función del tiempo de contacto con el lixiviado (15, 30, 45 d), siendo el E2 el más eficiente con una remoción de DQO de aproximadamente 736 mg/L y el E4 para el DBO₅ con una remoción de cerca de 54 mg/L de acuerdo a los promedios de las tres repeticiones analizadas a los 45 días de contacto.

El consumo por microorganismos es de cerca de 223 Kg/día tanto para invierno como verano, tomando en cuenta la concentración del E2 para el DQO; y el consumo por microorganismos en el invierno es de 15834 g/día y para el verano 15816 g/día tomando en cuenta la concentración del E4 para el DBO₅.

Estadísticamente se determinó que los consorcios más eficientes para la remoción de DQO y DBO fueron los ensayos E2 (~88%) y el E4 (~81%) respectivamente, conformados por microorganismos Gram positivos.

Referencias

1. Cheng, Y., Chon, K., Ren, X., Kou, Y., Hwang, M. H., & Chae, K. J. (2021). Bioaugmentation treatment of a novel microbial consortium for degradation of organic pollutants in tannery wastewater under a full-scale oxic process. *Biochemical Engineering Journal*, 175. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2021.108131>
2. Liu, Y., & Wang, J. (2020). Treatment of fresh leachate from a municipal solid waste incineration plant by combined radiation with coagulation process. *Radiation Physics and Chemistry*, 166, 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2019.108501>
3. Mawang, C. I., Azman, A. S., Fuad, A. S. M., & Ahamad, M. (2021). Actinobacteria: An eco-friendly and promising technology for the bioaugmentation of contaminants. In *Biotechnology Reports* (Vol. 32). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00679>

4. Ministerio del Ambiente, E., & Saneamiento Ambiental, M. de B. de A. S. (2017). ESTUDIOS DE DISEÑO DEFINITIVO DE CIERRE TÉCNICO DE BOTADEROS Y CELDA EMERGENTE PARA EL PAQUETE 5 CONFORMADO POR LOS GOBIERNOS AUTÓNOMOS DESCENTRALIZADOS MUNICIPALES DE LA MANÁ Y LATACUNGA, PROVINCIA DE COTOPAXI; BAÑOS, PROVINCIA DE TUNGURAHUA; RIOBAMBA Y CHAMBO, PROVINCIA DE CHIMBORAZO; Y MERA, PROVINCIA DE PASTAZA. FASE I: DIAGNÓSTICO DE LA SITUACIÓN ACTUAL DEL VERTEDERO DEL CANTÓN BAÑOS, ANÁLISIS Y SELECCIÓN DE ALTERNATIVAS DEL CIERRE TÉCNICO.
5. Quintero, J. (2014). Evaluación de humedales artificiales pilotos de flujo horizontal y tipo superficial y subsuperficial para el tratamiento de aguas residuales. *Ingenium*, 29.
6. Salgado Bernal, I., Durán Domínguez, C., Cruz Arias, M., Carballo Valdés, M. E., & Martínez Sardiñas, A. (2012). Bacterias Rizosféricas con potencialidades fisiológicas para eliminar materia orgánica de aguas residuales. *Revista Contaminación Ambiental*, 28, 17–26.
7. Yang, X., Meng, L., Meng, F., & Meng, F. (2019). Combination of self-organizing map and parallel factor analysis to characterize the evolution of fluorescent dissolved organic matter in a full-scale landfill leachate treatment plant. *Science of the Total Environment*, 654, 1187–1195. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.135>