

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Departamento de Ambiente y Desarrollo
Ingeniería en Ambiente y Desarrollo



Proyecto Especial de Graduación

**Comparación entre la eficiencia de la bio aumentación con
microorganismos eficientes para el tratamiento de aguas mieles**

Estudiante

Gustavo Adolfo Escobar Escobar

Asesores

Victoria Alejandra Cortes Matamoros, D.C.A.

José Fernando Tercero, M.Sc.

Héctor Sierra Canales, Lic.

Honduras, agosto 2023

Autoridades

SERGIO ANDRÉS RODRÍGUEZ ROYO

Rector

ANA M. MAIER ACOSTA

Vicepresidenta y Decana Académica

ERIKA TENORIO MONCADA

Directora Departamento Ambiente y Desarrollo

HUGO ZAVALA MEMBREÑO

Secretario General

Contenido

Índice de Cuadros	5
Índice de Figuras	6
Índice de Anexos	7
Resumen	8
Abstract	9
Introducción	10
Metodología.....	13
Recolección de Aguas Mieles	13
Caracterización Inicial de Aguas Mieles	14
Protocolo para Recuperación y Reproducción de Microorganismos Eficientes	14
Obtención y Cultivo de Microorganismos Eficientes	14
Extracción Microbiana	15
Aislamiento de Microorganismos	16
Conservación de Cepas	18
Reproducción y Re-Suspensión.....	18
Evaluación de la Degradación de Materia Orgánica en Aguas Mieles.....	20
Diseño Experimental y Preparación de Biorreactores	20
Evaluación y Monitoreo de las Unidades Experimentales.....	22
Análisis Estadístico	23
Resultados y Discusión.....	25
Protocolo para Recuperación y Reproducción de Microorganismos Eficientes	25
Protocolo para la Extracción de Microorganismos a partir del Efluente	26

	4
Fase de Reproducción	29
Eficiencias de Remoción de Materia Orgánica para Microorganismos Eficientes Cultivados	32
Resultados del Monitoreo de los Biorreactores	35
Conclusiones	40
Recomendaciones	41
Referencias.....	42
Anexos.....	44

Índice de Cuadros

Cuadro 1 Metodología para análisis de muestras en laboratorio	14
Cuadro 2 Sustratos y medios utilizados para la recuperación de microorganismos eficientes.	17
Cuadro 3 Resumen de microorganismos identificados	26
Cuadro 4 Materiales requeridos en la fase de extractiva	27
Cuadro 5 Materiales requeridos para la fase reproductiva	30
Cuadro 6 Remoción final promedio de sólidos totales y volátiles por tratamiento	33
Cuadro 7 Resultados de la aplicación de Kruskal-Wallis para los resultados de remoción de sólidos totales y sólidos volátiles.	34

Índice de Figuras

Figura 1 Esquema gráfico de la extracción, reproducción y puesta en marcha de reactores	21
Figura 2 Comparación de la suspensión de células con estándar de MacFarland.....	32
Figura 3 Evolución en el contenido de sólidos totales expresado en mg durante el tiempo de evaluación de los tratamientos.....	36
Figura 4 Evolución en el contenido de sólidos volátiles expresado en mg durante el tiempo de evaluación de los tratamientos.....	37
Figura 5 Curva de crecimiento de bacterias durante los días del experimento por tratamiento	39
Figura 6 Curva de crecimiento de levaduras durante los días del experimento por tratamiento	39

Índice de Anexos

Anexo A Tablas de recolección de datos.....	44
Anexo B Pruebas microbianas para realizar la bioprospección del medio	45
Anexo C Crecimiento de bacterias ácido-lácticas y levaduras.....	46
Anexo D Montaje de reactores con agua residual de la producción de café	47
Anexo E Materia orgánica en crisoles posterior a la prueba de sólidos totales	48
Anexo F Sólidos observados posterior a la prueba de sólidos volátiles	49

Resumen

Las aguas mieles son un subproducto del procesamiento húmedo del café, con potencial impacto ambiental cuando se descargan en el medio natural sin tratamiento previo. Lo anterior es debido a su composición rica en materia orgánica, en combinación con un pH ácido y otras propiedades fisicoquímicas. En el presente estudio se comparó la eficiencia de la aplicación de microorganismos eficientes para la reducción de la carga orgánica de las aguas mieles. El enfoque del experimento es cuantitativo mediante la realización de distintas pruebas en laboratorio asociadas a la propagación de microorganismos y medición de calidad de agua. Se realizó el montaje de cuatro tratamientos incluyendo un control de aguas mieles, reactores con la aplicación de microorganismos extraídos del residuo, microorganismos comerciales y la mezcla de ambos. Como resultados del estudio se generó un protocolo de obtención y propagación de microorganismos eficientes aislados a partir del residuo a tratar. Asimismo, no se encontró una diferencia significativa en la reducción de la carga orgánica del residuo entre los tratamientos, concluyendo que los procesos de bioaumentación no incrementan la eficiencia, pero tienen el potencial de disminuir el tiempo de retención hidráulica (TRH) requerido para completar los tratamientos. Asimismo, los microorganismos comerciales no lograron adaptarse al residuo, registrando un desempeño similar al control. Finalmente, se recomienda la readecuación del experimento para incluir enzimas, un consorcio más diverso y la utilización de un enriquecimiento nutricional para el medio.

Palabras clave: Agua residual, bioaumentación, biotecnología, tratamiento anaeróbico

Abstract

Waste water from coffee production is a residue of wet coffee processing with potential environmental impacts if discharged into the natural environment without prior treatment. This is due to its composition rich in organic matter, combined with an acid pH and other physicochemical properties. In the present study, the efficiency of the application of efficient microorganisms for the reduction of the organic load of coffee wastewater was compared. The experimental approach is quantitative, by performing different laboratory tests related to the propagation of microorganisms and measurement of water quality. Four treatments were set up, including a negative control, the addition of microorganisms extracted from the waste, the addition of commercial microorganisms and a mixture of both products to the coffee wastewater. A protocol for obtaining and propagating efficient microorganisms isolated from the wastewater to be treated was developed as a result of the study. Similarly, no significant difference was found between the treatments in reducing the organic load of the effluent, concluding that the bioaugmentation processes do not increase the efficiency of the treatment, but have the potential to reduce the time required to achieve it. Also, commercial microorganisms performed similarly to the control and were unable to adapt to the waste. Finally, it is recommended that the experiment be readapted to include enzymes, a more diverse consortium of microorganisms and the use of a nutrient enrichment for the medium.

Keywords: Anaerobic treatment, bioaugmentation, biotechnology, wastewater.

Introducción

El café es un grano perteneciente a la familia de las Rubiaceae, que representa el segundo producto comercial más importante del mundo solo superado por el petróleo. Este se transforma mediante procesos estandarizados que resultan de la interacción de prácticas post cosecha en los beneficios cafetaleros. Alrededor del mundo se consume un estimado de 3.5 billones de tazas de café diarias; las cuales provienen de la cosecha de 70 países con una producción estimada en 70 billones de libras en grano cada año (Blinová et al., 2017). El café representa el principal producto de exportación en Honduras, siendo el exportador mayoritario a nivel de Centro América para el 2011, el tercero a nivel de América latina y el sexto a nivel mundial (Bautista S., 2017).

Torres-Valenzuela et al. (2019) afirma que solo el 5% del peso del fruto fresco se utiliza para la preparación de la bebida, mientras que el otro 95% lo constituyen los residuos resultantes del proceso. Las aguas mieles son efluentes que resultan al retirar el mucilago de la cereza y representan gran cantidad de los efluentes generados. Enden y Calvert (2010), afirman que la cantidad de agua residual generada depende en gran medida de la tecnología empleada. De tal forma, mediante la utilización de procesos mecánicos modernos de eliminación de mucílago que producen café semi-lavado, donde sólo se requiere alrededor de 1 m³ de agua por tonelada de cereza fresca (sin fermentación final ni lavado), mientras que la técnica tradicional de lavado completo sin reciclaje utiliza hasta 20 m³ por tonelada de cereza.

Asimismo, la principal contaminación de las aguas residuales del café procede de la materia orgánica que se libera durante en el despulpado cuando se elimina el mesocarpio y se desintegra parcialmente la textura del mucílago que rodea al pergamino. El agua de despulpado se compone de azúcares de rápida fermentación procedentes de los componentes del mucílago. A su vez, este se componen en gran medida de proteínas, azúcares y el mucílago en particular de pectinas, es decir, carbohidratos polisacáridos (Enden y Calvert, 2010).

Dependiendo del método de procesamiento aplicado, se producen más aguas residuales en forma de pectinas hidrolizadas procedentes de la fermentación y el lavado. Durante la fermentación, las pectinas de cadena larga son divididas por enzimas (pectinasa, pectasa) en oligosacáridos de cadena corta. Los oligosacáridos son solubles en soluciones alcalinas y neutras, pero en condiciones ácidas son expulsados de la solución como ácido péctico (Enden y Calvert, 2010).

Múltiples autores afirman que este residuo es dispuesto comúnmente en cuerpos de agua próximos al lugar de proceso, sin recibir un tratamiento previo antes de ser vertido, ocasionando un relevante impacto ambiental y riesgos para la salud humana (Haddis y Devi, 2008). Actualmente, por falta de tecnología y voluminosidad, las aguas residuales de la producción de café terminan contaminando ríos, generando olores ofensivos y favoreciendo proliferación de moscas (Rattan et al., 2015).

Bajo este contexto se ha realizado abundante investigación sobre diferentes pretratamientos biológicos para la eliminación adecuada de aguas mieles, centrada principalmente en la reducción en la carga orgánica por sus efectos nocivos en el ecosistema. Según múltiples autores, la digestión anaerobia de las aguas mieles es posible a corto plazo, pero la sostenibilidad operacional del proceso puede llegar a ser un problema debido a la estacionalidad del residuo.

A pesar de que estas medidas son altamente funcionales en el tratamiento de estos efluentes, la implicación de un alto costo, una operación compleja y la necesidad de un tiempo prolongado limita la factibilidad de su implementación (Ijanu et al., 2020). Además, existe escasa documentación y registros sobre la eficacia de los métodos utilizados para el tratamiento de efluentes del procesamiento de café, especialmente para la producción a pequeña escala. Sin embargo, diversas fuentes reportan la utilización de sistemas basados en la digestión anaerobia, mecanismos de precipitación y compostaje como los más comunes.

Otro proceso ampliamente utilizado es la bio-aumentación, que consiste en la adición intencionada de microorganismos altamente eficientes, con el fin de aprovechar su potencial innato

y disminuir la carga orgánica dentro del efluente (Gamero, 2019). Actualmente, existe una amplia variedad de mezclas comerciales altamente difundidas que cumplen el mismo fin. Este explora las propiedades metabólicas degradables de los microbios a través de la conversión de compuestos orgánicos complejos en las formas más simples, además de eliminar eficazmente los compuestos de bajo peso molecular (Pires et al., 2021).

Si bien hay múltiples opciones para tratar las aguas mieles para su posterior eliminación, encontrar una forma económicamente rentable y altamente eficiente que permita disminuir al máximo la carga contaminante del agua es de suma importancia (Torres-Valenzuela et al., 2019). Ya sea para un pequeño productor o una multinacional, poder acceder a un modelo sustentable con un tratamiento que le permita cumplir con la norma ambiental vigente es fundamental. Con este fin, el objetivo general de esta investigación es analizar el efecto de los procesos de bio-aumentación en la disminución de la carga orgánica presente en aguas mieles del procesamiento del café, para lo cual se plantean como objetivos específicos: Desarrollar un protocolo para recuperación de microorganismos eficientes (ME) presentes en efluentes de aguas mieles para su reproducción y aplicación en procesos de bioaumentación; evaluar la reducción de materia orgánica presente en las aguas mieles mediante procesos de bioaumentación utilizando ME bajo condiciones controladas y; comparar el efecto de la adición de ME comerciales frente al de ME adaptados al residuo en la reducción de la carga orgánica.

Metodología

COMSA (Café Orgánico Marcala Sociedad Anónima) es una empresa cafetalera ubicada en el municipio de Marcala, La Paz, Honduras, que integra tecnologías de vanguardia en su proceso de producción y procesamiento del café. Esta entidad gestiona todos los aspectos de la cadena de producción, desde la etapa inicial hasta la comercialización. En el marco de esta investigación, las aguas mieles utilizadas fueron recolectadas en las instalaciones de COMSA durante los meses de enero a marzo de 2023. Asimismo, los análisis del estudio se desarrollaron en los laboratorios de la carrera de Ambiente y Desarrollo de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano del municipio de San Antonio de Oriente, Francisco Morazán, Honduras.

El estudio tiene un enfoque cuantitativo de carácter exploratorio, ya que se carece de información y estudios suficientes para establecer una conclusión general para la utilización de estos tratamientos. El mismo tiene un alcance correlacional debido a que los resultados buscan establecer una relación entre la adición controlada de microorganismos a un medio y la reducción de la carga orgánica presente. Asimismo, se busca relacionar la aplicación de productos comerciales, la adaptabilidad del consorcio de macroorganismos y la eficiencia para reducir la materia orgánica en aguas mieles. El estudio se desarrolló bajo un diseño cuantitativo experimental de tipo puro, ya que se controlaron las variables en laboratorio durante el proceso de experimentación.

Recolección de Aguas Mieles

La empresa cafetalera cuenta con un sistema de disposición de una pila donde se recolecta toda el agua residual procedente del beneficio húmedo del café, la cual es a su vez transportada diariamente para su disposición en su mayor parte directamente sobre el suelo de uso agrícola. Se recolectó una muestra de 5 L de la pila con el fin de poder suministrar el volumen necesario para las 24 unidades experimentales de 400 mL. Estas fueron contenidas en recipientes de plástico previamente desinfectados con hipoclorito de sodio al 0.1%, diluyendo 100 mL del desinfectante en 900 mL de agua. Posteriormente, las muestras fueron trasladadas al laboratorio para su

caracterización bajo condiciones de refrigeración para evitar la degradación y/o fermentación de la muestra del efluente.

Caracterización Inicial de Aguas Mieles

Con el fin de trazar una línea base para el estudio, se realizó una caracterización de las aguas mieles del beneficio húmedo de la empresa cafetalera COMSA (Anexo A). Sin embargo, solo se utilizaron parámetros de interés para los objetivos de la investigación. Se realizó la medición y el respectivo reporte del pH, sólidos totales y sólidos volátiles mediante métodos estandarizados para mediciones en laboratorio (Cuadro 1).

Cuadro 1

Metodología para análisis de muestras en laboratorio

Parámetros/unidades	Método	Referencia
pH	Método electrométrico (4500-H+)	APHA, 2017
Sólidos totales (mg/L)	Secado conforme al método 2540 B	APHA, 2017
Sólidos volátiles (mg/L)	Método 2540 E para sólidos fijos y volátiles	APHA, 2017
Temperatura (°C)	Método de laboratorio y campo	APHA, 2017
Unidades formadoras de colonia (UFC)	Cuantificación de UFC por mL de muestra	Wilson et al., 2017

Nota. Elaboración propia.

Protocolo para Recuperación y Reproducción de Microorganismos Eficientes

En esta sección, se presenta la metodología del protocolo propuesto en los resultados de esta investigación. Este abarca desde la extracción hasta la suspensión de microorganismos, con el propósito de establecer un enfoque integral y efectivo para su estudio y aplicación. Mediante un conjunto de pasos precisos y secuenciales, se busca facilitar la extracción selectiva de microorganismos, su posterior aislamiento y conservación, seguido de métodos para activar y reproducir estas poblaciones. Finalmente, este concluye con la suspensión final de los microorganismos para su utilización como inóculo de tratamiento.

Obtención y Cultivo de Microorganismos Eficientes

En primera instancia es importante considerar mantener las características intrínsecas (en la medida de lo posible) del efluente sobre el cual se planea realizar la purificación del microbiota

presente. Por ende, contemplar la temperatura de transporte se vuelve esencial para reducir la actividad metabólica de los microorganismos. Se debe mantener temperaturas de refrigeración para su almacenamiento evitando el punto de congelación. A temperatura ambiente o superior, comenzarán procesos de digestión y reproducción dentro del medio y, en el otro extremo, la congelación del agua residual puede causar muerte celular por la cristalización.

Extracción Microbiana

Se inició con la identificación y recolección de las cepas potenciales para la degradación de materia orgánica dentro de un efluente de aguas mieles, asegurando ciertas características en el consorcio de microorganismos. Esto con el fin de asegurar la tolerancia de estos en el medio y un efectivo desarrollo de sus procesos metabólicos. Con esto se busca generar una simbiosis que repercuta directamente en la facilidad de degradación del residuo que se refleje en una reducción de la materia orgánica presente. Para tal efecto, se realizó una bioprospección (Anexo B) del medio para identificar los tipos de microorganismos nativos del residuo bajo estudio, identificando principalmente su abundancia en el medio.

Para seleccionar las cepas a incluir dentro del consorcio utilizado como tratamiento se deben definir diferentes criterios de selección. Primero, se toma en cuenta el crecimiento dentro de medios selectivos para microorganismos de interés verificando el crecimiento visible en la placa. Otro factor es la velocidad de crecimiento de las cepas aisladas como un indicador probable de velocidad de reacción dentro del reactor, controlando los tiempos de crecimiento mediante el monitoreo de este. A su vez, debe tomarse en cuenta la abundancia de las cepas por mililitro de residuo inoculado, teniendo como criterio de aceptación un mínimo de 1×10^5 células. Finalmente, para la selección de bacterias se debe tomar en cuenta la producción de ácido monitoreada a través de verde de bromocresol como indicador, el cual genera un cambio de coloración en el medio en función de cambios en el pH.

Asimismo, se tomaron medidas para controlar específicamente aquellas variables que influyen en las condiciones limitantes intrínsecas del residuo a tratar. El inóculo se obtuvo a partir del residuo, fundamentado en la premisa de que este conjunto de microorganismos posee la capacidad de subsistir de forma inherente en el entorno. Además, se emplearon diversos medios de cultivo selectivos para separar las cepas pertenecientes a distintas familias de microorganismos. Dentro de estos medios, se realizaron pruebas de acidificación para evaluar la resistencia de los microorganismos a una disminución del pH en su entorno de crecimiento.

Aislamiento de Microorganismos

Para obtener una mezcla de microorganismos deseada y en concentraciones viables para inocular los tratamientos respectivos, se realizó el aislamiento de las cepas de interés. La preparación de la muestra para realizar la siembra se hizo mediante una dilución seriada, en donde se agregan 10 mL de efluente mediante una pipeta a 90 mL de Buffer Fosfato Salino (PBS) estéril contenido en un frasco de 120 mL para tener una dilución por un factor de 10. A partir de este punto y para alcanzar un factor de dilución de 1×10^{-6} , se añadió 1 mL de cada dilución previa a tubos de ensayo esterilizados, dentro de los cuales se había adicionado de 9 mL de PBS en cada uno. Para cada extracción es crucial utilizar puntas y pipetas estériles de forma independiente cada vez que se quiera formar una nueva dilución.

Posteriormente, se inoculó 1 mL en placas con agares selectivos para distintos microorganismos por la técnica de extensión en placa. La siembra se realizó por duplicado para cada dilución y en cada tipo de agar, utilizando las concentraciones de 10^{-2} , 10^{-4} y 10^{-6} con el fin de observar colonias separadas para su posterior aislamiento. En general, para cualquier agar que se pretenda verter en platos Petri, se recomienda calcular entre 20 a 25 mL de medio de cultivo por placa a preparar. El periodo de incubación se realizó durante 24 horas a una temperatura de 35 °C para bacterias y 27 °C para levaduras (condiciones que se repiten en cada periodo de incubación independientemente del medio).

En el Cuadro 2 se detalla la metodología empleada para la recuperación de microorganismos potencialmente eficaces. A grandes rasgos, se observa que no hay datos para *Pseudomonas* y *Enterobacterias* por no presentar resultados positivos con respecto a su presencia en el medio, teniendo crecimiento de BAL y levaduras (Anexo C) en Agar MRS (“Man, Rogosa y Sharpe”) y YPD (“Yeast extract Peptone Dextrose”) respectivamente. Asimismo, se consideran caldos de cultivo no selectivo para la fase reproductiva como el caldo BHI (Infusión cerebro corazón). Además, para aislar los microorganismos en crecimiento, se puede optar por medios menos selectivos, como el Agar TSA (Agar Triptona Soja). Por último, para su suspensión, se recurrió a un medio salino sin suplementos nutritivos conocido como PBS (Tampón fosfato salino).

Cuadro 2

Sustratos y medios utilizados para la recuperación de microorganismos eficientes.

Microorganismo	Sustrato utilizado	Medio de aislamiento	Medio para cepas	Medio de reproducción	Medio de mezcla y re-suspensión
BAL (hetero y homo fermentativas)	Aguas mieles	Agar MRS	Agar TSA	Caldo BHI	Solución PBS
Levaduras	Aguas mieles	Agar YPD	Agar YPD	Caldo YPD	Solución PBS
		Agar VRBG (Agar Bilis Glucosa con cristal violeta y rojo neutro)	-	-	-
Enterobacterias	Aguas mieles	Agar Cetrimide	-	-	-
<i>Pseudomonas</i>	Aguas mieles				

Nota. Elaboración propia.

Como parte del proceso de experimentación, se intentó ajustar el pH de los medios de cultivo lo más parecido a las condiciones del efluente con el fin de establecer una selección mediante la capacidad de estos microorganismos para tolerar condiciones ácidas. Sin embargo, se encontró que los componentes del agar se desnaturalizan propiciando una falta de rigidez cuando se reduce el pH

por debajo de 4.5. Asimismo, esto propicia una dificultad significativa para realizar procesos como las siembras por rayado, extensión e incluso para el periodo de incubación.

Posteriormente, los platos Petri inoculados se incubaron a una temperatura de 35 °C durante 24 horas para tener un crecimiento óptimo y notoriamente visible de los microorganismos. Luego del periodo de incubación se procedió a realizar un aislamiento de las colonias que reportaron un crecimiento notorio dentro de las placas. Con la ayuda de un aza de inoculación, se seleccionó una colonia aislada para sembrar en una nueva placa estéril con caldo nutritivo, utilizando como criterio de selección las diferencias morfológicas apreciables. Se realizaron siembras por duplicado dentro de los platos Petri mediante la técnica "streak plate", seleccionando 10 colonias por cada agar en el que se visualizó un crecimiento, para obtener cultivos puros de los microorganismos con las características requeridas. Este procedimiento se repitió hasta tres veces, para alcanzar un crecimiento uniforme de colonias puras sin contaminación.

Conservación de Cepas

Posterior a la purificación de los microorganismos, se procedió a la conservación de estos mediante la creación de un cepario almacenado bajo temperaturas de congelación. Mediante la utilización de un aza de inoculación esterilizada previamente con calor, se tomó una colonia purificada de las placas para inocular la masa celular en 9 mL de caldo BHI contenido en tubos de ensayo, este se dejó en incubación durante 24 horas a una temperatura de 35 °C realizando el mismo procedimiento para todas las colonias aisladas. Posterior a esto, se suspendieron las colonias reproducidas mediante una leve agitación del tubo con caldo para tomar 600 microlitros de este y disponer la muestra en tubos Eppendorf con capacidad de 1.5 mL. Asimismo, se adicionó 400 microlitros de glicerol a cada microtubo para evitar la congelación de la muestra y por consiguiente un potencial daño celular a las cepas conservadas.

Reproducción y Re-Suspensión

Posterior a esto y con el fin de utilizar las cepas conservadas, se realizó una reactivación de las cepas mediante caldo BHI. Luego de dejar ambientar las cepas y el caldo de cultivo para evitar un choque térmico, se tomó 200 microlitros de cada cepa aislada inoculando los tubos de ensayo con caldo para su crecimiento. Se dejó incubando durante 24 horas hasta observar un crecimiento notorio observado por la aparición de masa celular en el fondo del tubo o un cambio en la turbidez del medio. Asimismo, para verificar la pureza de las cepas se inoculó placas Petri con agar TSA y YPD para bacterias y levaduras respectivamente.

Verificada su pureza se procedió a realizar la suspensión de cada cepa conservada por separado. Se volvió a inocular tubos con caldo BHI con cada cepa dada la necesidad de contar con un cultivo joven para la suspensión celular. De este medio se tomó 1 mL y se dispuso en un microtubo para ser centrifugado a 1,000 rpm a 4 °C durante 5 minutos. Al tener la masa de células precipitadas se eliminó el sobrenadante de medio de cultivo y se realizaron tres lavados secuenciales con PBS siguiendo el mismo procedimiento para eliminar el sobre nadante inicial. Luego de este paso, el pellet de células libre de medio de cultivo fue resuspendido en el microtubo correspondiente y posteriormente agregado a un tubo con 9 mL de PBS. Este proceso se repitió para cada cepa reactivada.

La estimación de la concentración celular se realizó mediante una comparación visual de la turbidez tomando como referencia el estándar de MacFarland (Sutton, 2011) para una concentración de 1×10^8 UFC/mL. De esta forma, si llegaba a presentarse una turbidez notoriamente alta con respecto a la referencia, se diluyó hasta tener aproximadamente la misma turbidez. En caso contrario, cuando el medio carecía de una turbidez suficiente, se adicionó otro pellet de células correspondiente a otro mililitro de la misma cepa evaluada.

Finalmente, ajustada la concentración de células en el medio, se formaron dos consorcios microbianos a partir de la mezcla de las 10 cepas de levaduras y las 10 cepas de bacterias (cada familia por separado). Asimismo, la inoculación de los diferentes reactores identificados con este tratamiento

fue llevada a cabo cuando el cultivo compuesto por el consorcio de microorganismos alcanzó la concentración estimada en la etapa previa.

Evaluación de la Degradación de Materia Orgánica en Aguas Mieles

La bioaumentación engloba la incorporación planificada de microorganismos específicos en momentos distintos al microbiota autóctono del medio a tratar. Este proceso se lleva a cabo con un propósito determinado, que suele ser la disminución de uno o varios componentes considerados no deseables en el material objeto de tratamiento. Normalmente son utilizados microorganismos eficientes que poseen mecanismos metabólicos que generan una simbiosis entre ellos. Estos utilizan los compuestos contenidos en el efluente como una fuente de alimentación para suplir requerimientos nutricionales y reproducirse.

Con el fin de establecer un criterio de adecuación o, en su defecto, la determinación de la pertinencia de implementar tratamientos complementarios al concluir el estudio, se aplicaron los criterios establecidos en las regulaciones técnicas para vertido de aguas residuales en cuerpos receptores y sistemas de alcantarillado, vigentes en Honduras desde 1997. Además, se emplearon las características planteadas como indicadores de eficacia para la investigación, con relación a los parámetros que fueron evaluados.

Diseño Experimental y Preparación de Biorreactores

Para evaluar el efecto de la concentración de los microorganismos eficientes (ME) y comerciales en el tratamiento de aguas mieles se prepararon diferentes reactores para tres tratamientos denominados "A" (m. extraídos), "B" (m. comerciales), "C" (combinación de "A" y "B") y un control para un total de 24 reactores con un volumen de 400 mL (Figura 1). De estos, 12 fueron inoculados con 2 mL del cultivo extraído a una concentración de 1×10^8 células por cada mililitro, 12 con 2 mL de microorganismos comerciales y seis sin adición de microorganismos que sirvieron de control (Anexo D). Se evaluó el desempeño de las unidades experimentales (UE) en un espacio de 20 días. Del total de los seis reactores incluidos en cada tratamiento, se seleccionó de forma aleatoria un

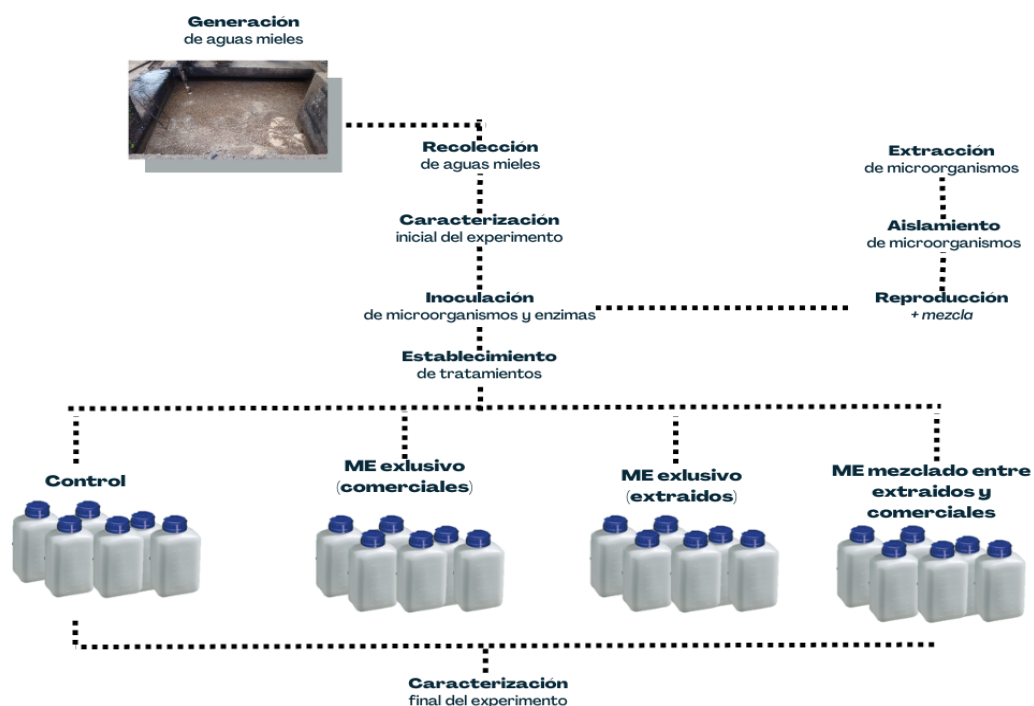
total de tres UE para monitorear la evolución del comportamiento microbiano y la reducción de materia orgánica en el tiempo.

Para la adición del producto comercial se utilizó la recomendación del fabricante, la cual consistía en la adición de 0.429 mg por mililitro. De esta forma, se preparó la disolución añadiendo 0.429 g del producto a 1 L de agua peptonada, sometiéndolo a agitación leve pero continua durante 5 minutos para realizar una disolución completa. Posteriormente, se adicionó 2 mL de la disolución como dosis para los reactores correspondientes.

Durante el experimento se monitorearon variables de temperatura, irradiancia y pH, considerando la eficiencia y supervivencia de los microorganismos utilizados. Se mantuvieron condiciones adecuadas dentro del laboratorio para que estas no representaran una limitante en los procesos metabólicos de los microorganismos, teniendo como única variable de control las condiciones anaeróbicas de los reactores. En este contexto, el experimento se desarrolló a temperatura ambiente, evitando la influencia de los sistemas de aire acondicionado del recinto. Además, se evitó el incremento de la presión interna del reactor liberando diariamente los gases generados. Asimismo, se mantuvieron las condiciones de anaerobiosis del medio mediante la utilización de sellos de aluminio y tapones de goma.

Figura 1

Esquema gráfico de la extracción, reproducción y puesta en marcha de reactores



Nota. Elaboración propia.

Evaluación y Monitoreo de las Unidades Experimentales

Para monitorear la evolución de las características fisicoquímicas del residuo, se realizaron mediciones cada 5 días a lo largo de un periodo de 20 días que comprende el tiempo de retención hidráulica del experimento. En los mismos se registró pH y temperatura para verificar el mantenimiento de las condiciones óptimas para el desarrollo y proliferación de los microorganismos inoculados. Además, se analizó la concentración de sólidos totales (Anexo E) y volátiles (Anexo F) para registrar los cambios de la materia orgánica dentro de los reactores a lo largo del tiempo. Por otro lado, se realizó el conteo de la población de microorganismos mediante la metodología expuesta en la caracterización inicial.

En cada muestreo se tomó un pequeño porcentaje del volumen total de aguas mieles de cada UE en recipientes estériles. Estos a su vez, fueron analizados inmediatamente luego de la extracción para evitar cambios considerables de las características del medio. Esto considerando que los procesos de digestión son constantes por la utilización de microorganismos en el proyecto.

Para los conteos bacterianos, las muestras fueron llevadas a una temperatura de 4 °C para ralentizar el crecimiento y acción microbiana. Posteriormente, se estudió la población total de bacterias y levaduras tanto en el control como en los tratamientos con la técnica de dilución en serie. La dilución se llevó a cabo utilizando 10 mL de la muestra para la primera etapa de dilución, seguido de la toma de 1 mL de esta dilución para alcanzar una concentración adecuada para el recuento en placas. Posteriormente, se añadió 1 mL de la alícuota respectiva en las placas Petri estériles si se utilizaba la técnica de vaciado en placa y 0.1 mL añadido en la superficie del agar solidificado para aplicar el inóculo por extensión en superficie.

Por otro lado, para conocer las diluciones efectivas para realizar conteos en placa, se aplicó una metodología derivada de los ceros de "Poisson" o número más probable. De esta forma, se realizó una dilución seriada del residuo directamente en caldo BHI para observar en que diluciones se presentaba crecimiento. Asimismo, se seleccionaron los últimos dos tubos con una turbidez significativa y el primero sin cambios aparentes. En la generalidad, se pudo realizar el conteo en placa a partir del último tubo que presentó un cambio en la turbidez del medio (indicador de crecimiento microbiano).

Para el monitoreo de carga microbiana, se utilizaron 20 mL de dos tipos de medio de cultivo: agar TSA fundido estéril para el crecimiento de bacterias y agar YPD enriquecido con antibiótico (Kanamicina en una proporción de 50 mg/L de medio) para el conteo de levaduras. Las placas fueron incubadas a 35 °C durante 24 horas para bacterias y a 27 °C durante 24 horas para levaduras. Para la preparación del antibiótico se pesó 50 mg en un microtubo estéril en el cual se diluyó con 1 mL de PBS para adicionar a 1 L de medio de cultivo posterior a su esterilización respectiva. A partir de esta relación se realizó la conversión para preparar menores cantidades de medio.

Análisis Estadístico

Para el análisis de los resultados, se aplicó la prueba de normalidad de "Shapiro-Wilk" para verificar la distribución normal de los datos, y se evaluó la homogeneidad mediante el examen de los

residuales previamente calculados. Dado que se obtuvieron datos con distribución normal, pero con cierta heterogeneidad, se optó por emplear la prueba de "Kruskal-Wallis" para el análisis de los tratamientos. Todos los análisis se llevaron a cabo utilizando el software estadístico "InfoStat®", con un nivel de significancia del 90%. Finalmente, se empleó estadística descriptiva para presentar la reducción porcentual de cada tratamiento con relación al valor inicial, tal como se había establecido en la caracterización inicial del efluente.

Resultados y Discusión

Las aguas residuales de la producción de café se caracterizan por presentar condiciones extremas, teniendo una propensión a presentar valores de pH considerablemente bajos y una alta demanda química y biológica de oxígeno por la presencia de una gran cantidad de materia orgánica potencialmente degradable. El efluente recolectado no fue la excepción a estas tendencias, presentando valores de pH iniciales de 4.10 y una temperatura de aproximadamente 24 °C dentro de las pilas de almacenamiento.

A partir de la caracterización inicial de la muestra se obtuvieron valores de carga orgánica (SV/volumen) considerables, los cuales ya eran esperados debido a las estimaciones del rango sugerido en otras investigaciones que variaba según la fuente y el proceso aplicado al café (Torres-Valenzuela et al., 2019). De esta forma, se obtuvieron concentraciones promedio de 14,857.2 mg/L para sólidos totales, 13,035 mg/L de sólidos volátiles con y 28,700 mg/L en función de la cantidad de oxígeno necesaria para oxidar la materia orgánica presente (DQO).

Protocolo para Recuperación y Reproducción de Microorganismos Eficientes

En el Cuadro 3 se detallan los resultados obtenidos durante los procesos de extracción de microorganismos a partir del residuo seleccionado, que servirán como respaldo para definir el protocolo de recuperación, conservación y posterior reproducción para su aplicación en laboratorio. Durante esta fase se identificó la presencia de dos familias en particular, comprendida entre Levaduras y *Lactobacillus*. Sin embargo, se realizaron una serie de ensayos mediante diferentes medios de cultivos selectivos entre los que se incluían los comúnmente usados para el crecimiento de pseudomonas y enterobacterias.

Cuadro 3

Resumen de microorganismos identificados

Medio de cultivo	Microorganismo	Abundancia (UFC/mL)
Medio Man, Rogosa y Sharpe (MRS)	Bacterias ácido-lácticas (Lactobacilos)	3.50E+05
Yeast extract Peptone Dextrose (YPD) + Kanamicina	Levaduras no filamentosas	1.91E+05

Nota. Elaboración propia.

Pudiendo constatar que no se presentó crecimiento en ningún otro medio que en los microorganismos descritos previamente. Asimismo, solo se estableció la identificación de las cepas en función del medio de crecimiento debido a limitaciones del laboratorio. Por otro lado, el agar utilizado para levaduras si bien promueve su crecimiento, no es necesariamente selectivo. Por ello, con la premisa de solo tener crecimiento de bacterias como contraparte, se decidió utilizar Kanamicina como un antibiótico que fue agregado al medio. Esto confirmo que los microorganismos en crecimiento no eran en realidad bacterias.

Por otro lado, se realizaron pruebas en los medios para recrear las condiciones a las que estarían expuestas dentro del efluente, sin embargo, no resultaron ser viables en la aplicación. Por un lado, independientemente de la concentración del ácido, al reducir el pH del medio a valores por debajo de 4.5 la solidez y resistencia de este se ve altamente perjudicada inhibiendo el crecimiento adecuado de los microorganismos y dificultando en gran medida el proceso de incubación por colapsarse cuando es dado vuelta para evitar la acumulación de agua condensada en el Petri. Por ello, se decidió utilizar el pH normalizado de los medios de cultivo utilizado.

Protocolo para la Extracción de Microorganismos a partir del Efluente

En el ámbito de la biotecnología ambiental, la extracción y selección eficiente de microorganismos a partir de efluentes representa un paso crítico para el desarrollo de soluciones sostenibles en la gestión de residuos y la mejora de la calidad del agua. En la primera fase del protocolo, se presenta un enfoque específico y práctico para el aislamiento y la identificación de microorganismos clave, brindando a los investigadores una herramienta precisa y efectiva para el

aislamiento de microorganismos a partir de efluentes de la producción cafetalera. Se presenta una tabla resumen de los materiales necesarios durante esta sección que varían entre medios de cultivo, soluciones, herramientas y material de laboratorio (Cuadro 4).

Cuadro 4

Materiales requeridos en la fase de extractiva

Reactivos	Equipo
YPD Agar	Placas Petri estériles
MRS Agar	Puntas de 1 mL
Agar nutritivo	Micropipeta de 100 μ l – 1000 μ l
Kanamicina	Haza de inoculación
PBS	Microtubos
Glicerol	Frascos de vidrio para dilución
	Envases de vidrio para almacenar medios

Preparación de Medios.

Preparar el medio MRS y YPD pesando el medio en polvo adecuado y añadiéndolo al agua en un matraz estéril.

Auto clavar los medios durante 15 minutos.

Preparar una disolución de Kanamicina utilizando una dosis de 50 mg diluidos en 1 mL de PBS por litro de medio. Añadir el antibiótico directamente en un microtubo y diluir posteriormente con 1 mL de PBS. Mantener condiciones inocuas en todo el proceso de preparación.

Añadir Kanamicina al medio YPD justo después de la esterilización del medio según lo preparado.

Preparación de la Muestra.

Realizar una dilución primaria de la muestra en un frasco con 90 mL de PBS añadiendo 10 mL del residuo.

Realizar una dilución seriada en tubos de ensayo con 9 mL de PBS, agregando 1 mL de la dilución previa. Utilizar puntas nuevas cada vez que se realice una nueva dilución.

Siembras a partir de la Muestra.

Realizar siembras por duplicado mediante la técnica de extensión en superficie para levaduras en medio YPD. Para realizar la inoculación agregar 0.1 mL de la dilución correspondiente en la superficie del medio solidificado.

Sembrar levaduras en las diluciones correspondientes a 1×10^{-2} , 1×10^{-3} y 1×10^{-4} .

Realizar siembras por duplicado mediante la técnica de vaciado en placa para bacterias en medio MRS. Para realizar la inoculación agregar 1 mL de la dilución correspondiente en el medio aún líquido (no caliente) realizando movimientos en ocho para integrar el volumen agregado.

Sembrar bacterias en las diluciones correspondientes a 1×10^{-5} , 1×10^{-6} y 1×10^{-7} .

Purificación de las Cepas.

Identificar cepas que cumplen con los criterios de selección. Utilizar criterios de morfología y coloración.

Extraer colonia aislada mediante un aza de inoculación estéril.

Inocular cepas en un plato Petri con agar nutritivo solidificado aplicando la técnica de “streak plate”.

Seleccionar 10 diferentes colonias y seguir mismo procedimiento de purificación.

Incubar 24 horas a 35 °C las placas inoculadas con bacterias.

Incubar 24 horas a 27 °C las placas inoculadas con levaduras.

Repetir pasos anteriores hasta que la placa manifieste un solo tipo de crecimiento (de dos a tres veces).

Conservación de Cepas Seleccionadas.

A partir de los Petri con colonias purificadas seleccionar una colonia aislada con un aza de inoculación estéril y se sumergir en un tubo de ensayo con caldo nutritivo (esterilizar luego de cada inoculación en tubo).

Dejar incubar bajo las condiciones de temperatura y tiempo previamente especificadas.

El crecimiento en caldo puede reflejarse en el cambio de la turbidez del medio (volviéndose más opaco), crecimiento de masa celular notorio en el fondo del tubo o crecimiento en la superficie del medio. Para efectos de este procedimiento no se desea la presencia de crecimiento superficial, ya que tiene la probabilidad de presentar la necesidad de condiciones aerobias o micro aerobias para su crecimiento. Esto puede deberse a la presencia de microorganismos que paulatinamente crecerían en la superficie del efluente o bien, una contaminación por una mala praxis a la hora de realizar las siembras.

A continuación, se indica el proceso a seguir posterior a la comprobación de crecimiento celular:

Suspender el pellet de células sedimentado en los tubos de caldo previamente inoculados e incubados con las colonias purificadas.

En un microtubo con capacidad de 1.5 mL, adicionar 0.6 mL de la suspensión de células y 0.4 mL de glicerol.

Ubicar cepas dentro de una caja desinfectada de almacenamiento "Eppendorf".

Llevar a temperaturas de congelamiento las cepas aisladas y conservadas.

El glicerol servirá como un aislante término para evitar que la cepa llegue a congelarse aún siendo conservada a temperaturas inferiores al punto de congelación. Estas durarán alrededor de tres meses con características óptimas posterior a su preparación.

Fase de Reproducción

A continuación, se presenta la segunda sección del protocolo propuesto, el cual presenta un método para llevar a cabo la reproducción de microorganismos en condiciones de laboratorio, permitiendo a los investigadores estudiar y manipular su crecimiento de manera precisa y controlada para aplicaciones en diversas áreas de investigación. A su vez, se provee una lista de los recursos que se utilizarán a través del proceso (cuadro 5), cuyas cantidades variarán en función de la metodología utilizada y la experiencia práctica del operador.

Cuadro 5*Materiales requeridos para la fase reproductiva*

Reactivos	Equipo
YPD Agar	Placas Petri estériles
TSA Agar	Puntas de 1 mL
Agar nutritivo	Micropipeta de 100 μ l – 1000 μ l
Kanamicina	Aza de inoculación
PBS	Microtubos
	Tubos de ensayo con tapa de rosca
	Envases de vidrio para almacenar medios

Reactivación de Cepas.

Extraer 0.1 mL con micropipeta de cada cepa conservada y agregar en tubos de ensayo con 9 mL de agar nutritivo previamente esterilizado. Utilizar material esterilizado y puntas individuales para cada inoculación es esencial.

Dejar incubar por al menos 24 horas hasta observar crecimiento con las especificaciones de temperatura para bacterias y levaduras descritas anteriormente.

Verificación de Pureza de Cepas.

Sembrar a través de la técnica de “streak plate” utilizando un aza de inoculación estéril para cada siembra. Sumergir hasta alcanzar el pellet de células en el fondo del tubo de crecimiento.

Utilizar agar TSA para reproducción en medio sólido de bacterias.

Utilizar agar YPD para reproducción en medio sólido de levaduras.

Seguir especificaciones de incubación previamente descritas.

Si los resultados muestran un conjunto de colonias heterogéneas se debe repetir la prueba de pureza a partir de la cepa conservada, y si aún persisten los resultados se aconseja repetir el procedimiento de purificación y creación de la cepa si es necesario. De otra manera, si resulta un crecimiento homogéneo de células se procede a realizar la suspensión de cada cepa, dónde se debe llevar a la concentración necesaria para inocular.

A continuación, se muestra el proceso para desarrollar el inóculo-tratamiento, comprendido entre las fases de suspensión, preparación de estándar de turbidez y preparación del inóculo:

Suspensión de Células.

Inocular e incubar nuevos tubos con caldo nutritivo, repitiendo el procedimiento estándar explicado hasta ahora para la inoculación de caldos de cultivo a partir de colonias crecidas en platos Petri.

Suspender material celular a través de una leve agitación.

Introducir 1 mL de este medio crecido a un microtubo con capacidad de 1.5 mL.

Centrifugar microtubos a 1,000 rpm y 4 °C durante 5 minutos.

Descartar el material sobre nadante correspondiente al medio de cultivo.

Agregar 1 mL de PBS estéril al pellet de células y suspender el pellet mediante pequeños toques a la base el microtubo para que pueda integrarse al PBS añadido.

Centrifugar nuevamente y se repetir el proceso de dos a tres veces para retirar de manera efectiva el medio de cultivo adherido.

Vaciar completamente pellet de células final suspendido en PBS, en tubos con 9 mL de PBS estéril y homogenizar mediante una agitación suave.

Estimar la concentración obtenida para cada cepa a través de la turbidez obtenida. Utilizando como referencia el estándar de McFarland.

Preparación del Estándar de McFarland.

Preparar dos soluciones: una de cloruro de bario (BaCl_2) al 1% y otra de ácido sulfúrico al 1%.

Agregar 9.950 mL de la solución del ácido a 50 microlitros de solución de cloruro de bario para obtener una concentración simulada de 1×10^8 células/mL.

Preparación del Inóculo

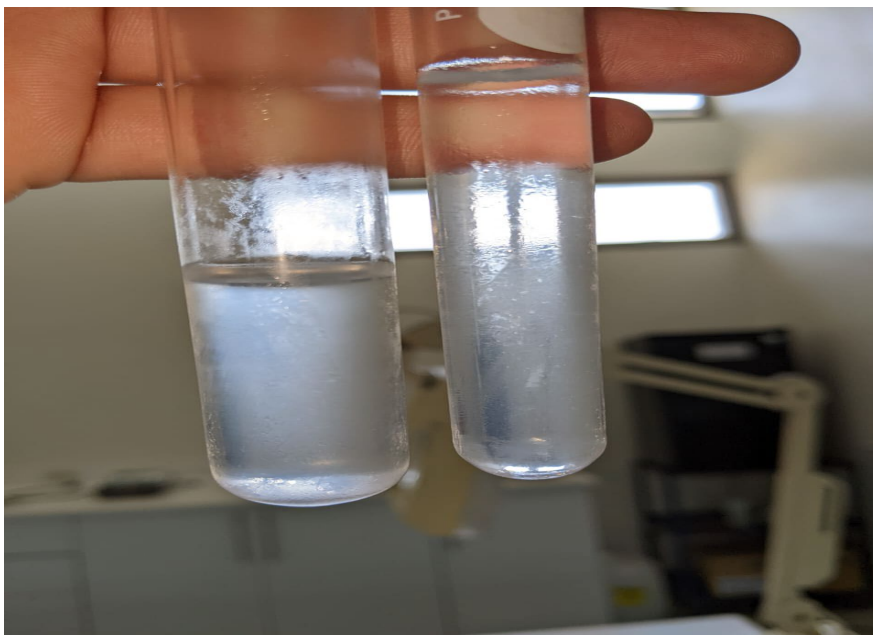
Comparar turbidez con cada tubo de células suspendidas (Figura 2). Si es mayor diluir con PBS hasta tener concentración deseada y si es menor agregar otro pellet de células a la suspensión y luego diluir de ser necesario.

Integrar la concentración de células ya estandarizadas en un solo vial para las 10 cepas de levaduras.

Integrar la concentración de células ya estandarizadas en un solo vial para las 10 cepas de bacterias.

Figura 2

Comparación de la suspensión de células con estándar de MacFarland



Eficiencias de Remoción de Materia Orgánica para Microorganismos Eficientes Cultivados

Durante el experimento se pudieron observar diferentes características asociadas al comportamiento de la materia orgánica presente en los reactores. Pasados los primeros tres días del experimento, se comenzaron a formar tres fases en todos los reactores comprendidas entre la formación de natas, sólidos disueltos y sólidos sedimentados. Con respecto a la coloración opaca

característica de la fase disuelta, no cambió significativamente a lo largo del experimento, lo que entra en concordancia con los resultados de remoción expuestos.

A su vez, se observó que gran parte de las natas que conformaban la capa superior estaban constituidas por los sólidos suspendidos influenciados por las burbujas de gas formadas en la base del reactor. Este último presentó el indicio más importante sobre la actividad de los microorganismos en el tiempo de retención, indicando una producción notable durante los primeros 10 días de tratamiento, decayendo paulatinamente entre los días 10 y 15 del experimento.

Con el fin de evaluar la eficacia de los procesos de bio aumentación, se tomaron los parámetros evaluados durante la caracterización inicial en 12 diferentes reactores que corresponden a los cuatro tratamientos evaluados los cuales contaban con tres repeticiones cada uno. Además de la cantidad de materia orgánica expresada en sólidos totales y volátiles, se obtuvieron los porcentajes de remoción respecto a los valores iniciales obtenidos (Cuadro 6). Asimismo, en valores totales porcentuales, el tratamiento "C" presentó una mayor remoción con valores de hasta 13.89% para ST y 15.83% para SV, mientras que el menos efectivo fue el tratamiento de control con una remoción de hasta un 11.25% para ST y 12.83% para SV (Cuadro 5).

Cuadro 6

Remoción final promedio de sólidos totales y volátiles por tratamiento

Tratamiento	Sólidos totales removidos (mg)	Sólidos Volátiles removidos (mg)	Reducción de sólidos totales (%)	Reducción de sólidos volátiles (%)
A	782	799	13.15	15.32
B	782	799	13.16	15.32
C	825	825	13.89	15.83
Control	669	669	11.25	12.83

Al realizar un filtro de calidad de los datos se descubrió que a pesar de que siguen una tendencia normal, la variabilidad intrínseca de este tipo de evaluaciones redujo significativamente la homocedasticidad de los datos, lo cual influye directamente en la homogeneidad de los datos. Por

ello, se realizó la prueba no paramétrica “Kruskal-Wallis” para identificar la existencia de una diferencia estadística sobre los datos. Sin embargo, durante la prueba se obtuvo una probabilidad muy por encima del valor de significancia de 0.05 tanto para sólidos totales como para volátiles (Cuadro 7), por lo que se pudo concluir que estos valores no poseen una diferencia significativa como para establecer un tratamiento efectivo en comparación con el control.

Cuadro 7

Resultados de la aplicación de Kruskal-Wallis para los resultados de remoción de sólidos totales y sólidos volátiles.

Tratamiento	mg de ST removidos			mg de SV removidos		
	N	Mediana	P	N	Mediana	P
A	3	804.00	0.4329	3	851.00	0.5160
B	3	776.00		3	788.00	
C	3	870.00		3	959.00	
Control	3	699.00		3	693.00	

Existe variedad de razones mencionadas en la literatura por las que un sistema de tratamiento fracasa cuando se ven involucrados procesos de bio-aumentación. Sin embargo, gran parte de estos residen en la dificultad que tienen los consorcios microbianos para adaptarse a las condiciones naturales en las que se encuentra el residuo. Este factor puede descartarse en la medida que se toma en cuenta que el inóculo añadido al medio procedía del efluente, por lo que resistencia y capacidad de degradar ese tipo de materia orgánica no debería sugerir una limitante para el proceso. Asimismo, se descartan escenarios de competencia o inhibición sobre el microbiota natural del efluente por la misma razón de la naturaleza y origen de los microorganismos.

Por otro lado, Herrero y Stuckey (2015) mencionan que incluso microorganismos pertenecientes al mismo género no son adecuados para los mismos propósitos y, por tanto, algunos pueden representar una competencia en una amplia gama de condiciones, mientras que otros solo trabajan bajo condiciones especializadas. A su vez, se explica que se ha observado que la diferenciación a nivel de cepa en relación con su persistencia posterior a la inoculación puede

conllevar a sistemas más eficientes. En un estudio realizado por Wenderoth et al. (2003) se demostró que solo ciertas cepas de la misma especie tenían un resultado significativo para reducir el residuo en cuestión, mientras que otras con las mismas capacidades metabólicas demostraron solo una leve mejora en las condiciones evaluadas.

También se menciona que la falta de eficiencia de estos tipos de tratamiento puede deberse frecuentemente a condiciones limitantes de crecimiento. Estas pueden variar desde la presencia de sustancias inhibitoras que entran al residuo en bruto antes de su recolección o incluso del mismo proceso metabólico de los microorganismos presentes. Por otro lado, puede presentarse el escenario de una limitada presencia de nutrientes necesarios para los procesos metabólicos de los microorganismos de interés, pero que se encuentran en pequeñas cantidades de tal forma que interrumpen el proceso de tratamiento. Se sabe que todos los organismos vivos están sujetos a la Ley del Mínimo de Liebig, según la cual la actividad metabólica y el crecimiento están limitados por el requisito ambiental o nutriente disponible en cantidad mínima (Calabrese y Kostecki, 1992; Roleda y Hurd, 2019).

Resultados del Monitoreo de los Biorreactores

A pesar de que los procesos de reducción de materia orgánica no hayan sido realmente efectivos o significativamente diferentes respecto a dejar trabajar el efluente por sí mismo, durante el monitoreo se evaluó el comportamiento de los microorganismos y su relación con el efluente. De tal forma, se pudo observar diferencias relevantes durante el proceso de reducción, de modo que el principal factor a destacar es la velocidad con la cual ocurre el proceso de degradación. Esto entra en relevancia desde que el tiempo de retención hidráulica (TRH) en sistemas de tratamientos influye directamente en el área necesaria para su establecimiento, lo cual a su vez repercute significativamente en costos asociados.

En la Figura 3 y 4 se puede observar dos tendencias marcadas que se presentan en la reducción de materia orgánica. El tratamiento B constituido por la utilización de microorganismos

eficientes comerciales, se ve caracterizado por un comportamiento de reducción de materia orgánica más lento con una forma más parecida al control del experimento. Esto representa un indicador sobre la baja supervivencia, adaptabilidad o influencia de los microorganismos agregados del producto comercial, cuya diferencia sobre el control puede asociarse a diferentes factores como lo pueden ser las enzimas contenidas en el producto.

Por otro lado, se observa que la tendencia del tratamiento A y C corresponde a una reducción acelerada de la materia orgánica. A pesar de que los valores finales en el día 20 no posean una diferencia significativa, la reducción materia orgánica en el tiempo llega a tener su significancia cuando se asocia al TRH necesario para llegar a los valores máximos de reducción obtenidos en el experimento. Se puede apreciar que, tanto en la reducción de sólidos totales como volátiles, para el día 15 el tratamiento "A" está cerca de igualarse con el valor presente en el tratamiento control, mientras que en el tratamiento "C" ya ha superado de manera contundente este valor. Esto puede representar una reducción de hasta 5 días en el período requerido para remover la materia orgánica presente.

Figura 3

Evolución en el contenido de sólidos totales expresado en mg durante el tiempo de evaluación de los tratamientos

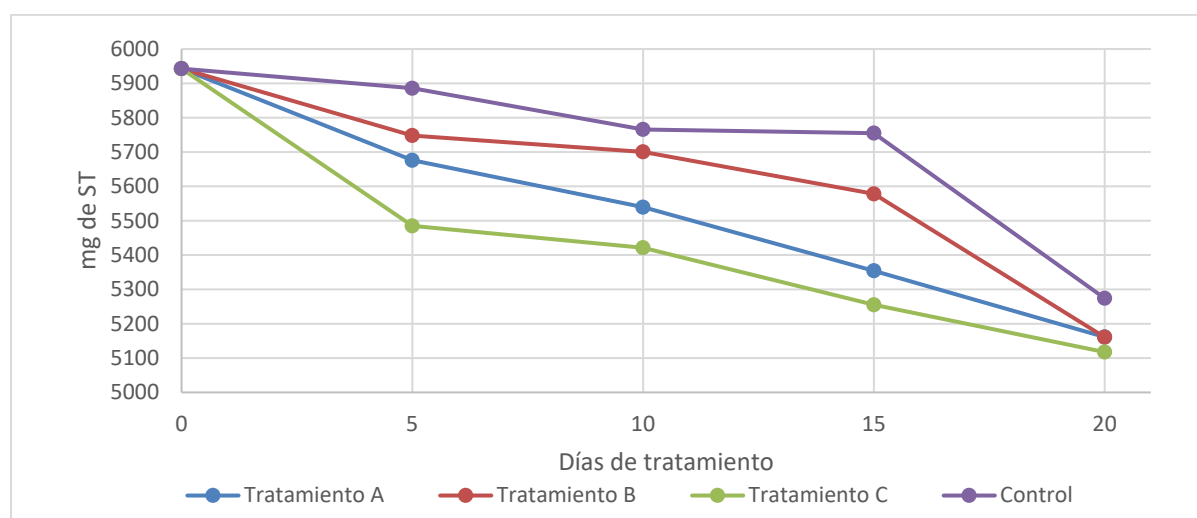
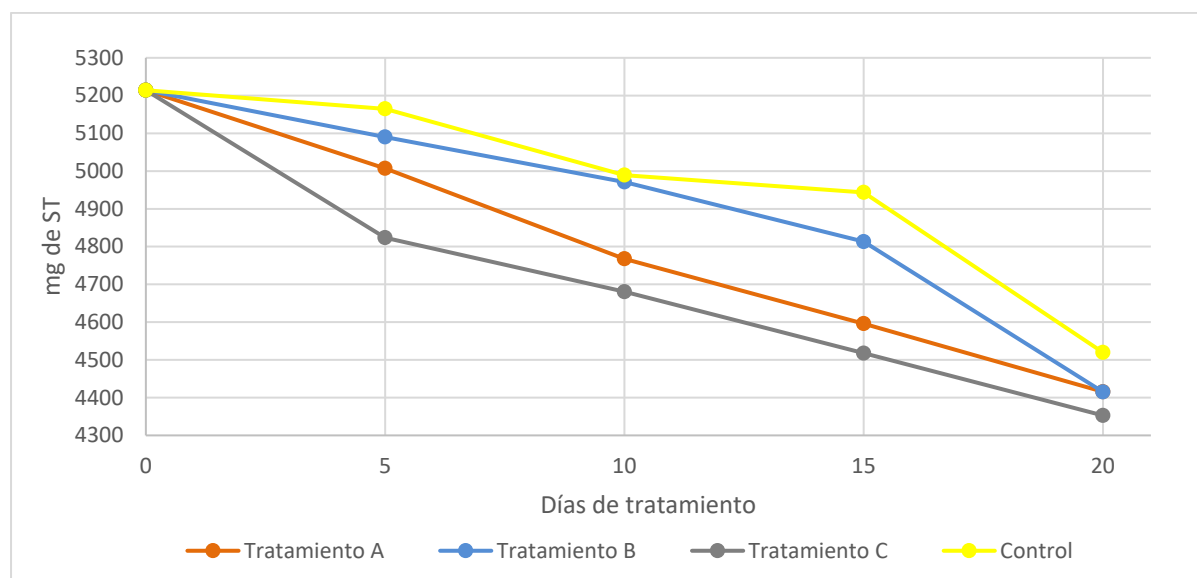


Figura 4

Evolución en el contenido de sólidos volátiles expresado en mg durante el tiempo de evaluación de los tratamientos



Asimismo, este comportamiento entra en concordancia y se justifica bajo los resultados del monitoreo de la persistencia de los microorganismos durante los diferentes días de muestreo (Figura 5 y 6). De esta forma, se puede observar que los tratamientos influenciados por procesos de bio-aumentación tienen un incremento directo en la abundancia de microorganismos presentes en el día 0 por la adición del inóculo, que paulatinamente incrementa a valores superiores a 1×10^{16} UFC/mL pero que alcanzaron periodos de mortalidad más rápidos que el control. Sin embargo, esto se refleja en una reducción de materia orgánica más abrupta y consecuentemente en un menor tiempo, lo cual puede visualizarse en la gráfica por un menor tiempo en la etapa estacionaria.

Por otro lado, el tratamiento "C" mostró un crecimiento más acelerado de las unidades formadoras de colonia, lo cual se puede deber a la inclusión del producto comercial cuya adición pudo haber facilitado la disponibilidad de alimento para su reproducción por la presencia de enzimas y demás componentes. Por otro lado, el comportamiento del tratamiento "B" con respecto al control

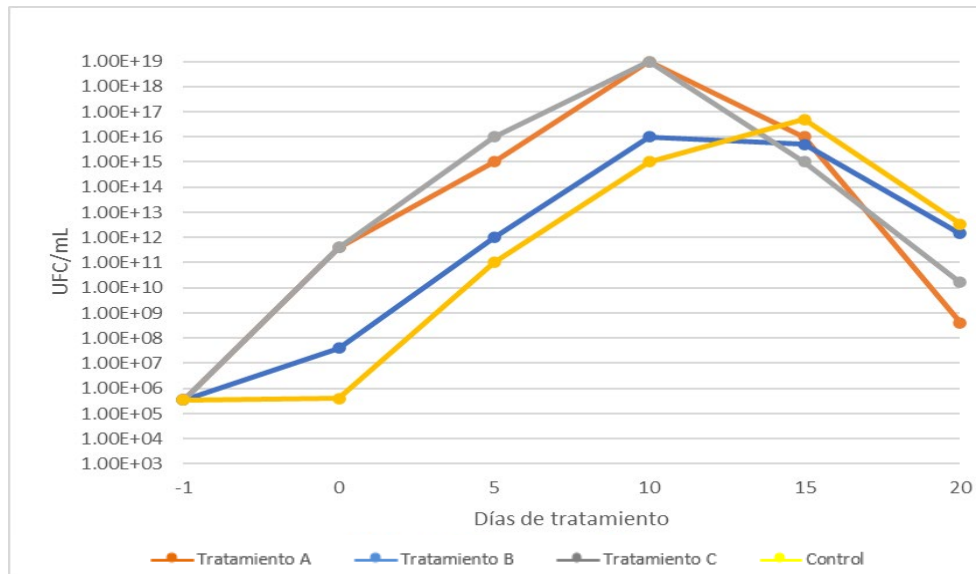
se muestra similar, lo que supone una baja influencia del tratamiento utilizado. Asimismo, se considera que el trabajo de reducción de materia orgánica se debió principalmente a los microorganismos que se encontraban desde un inicio en el efluente. Se pudo percibir que los reactores bajo estos tratamientos entraron a su fase estacionaria de forma más tardía, la cual todavía se presentó activa al momento de parar el experimento.

A su vez, durante el monitoreo se evaluaron de forma descriptiva ciertos parámetros como la separación de sólidos en diferentes fases, su color, la transparencia en la fase de sólidos disueltos y la producción de gas, siendo este último el más relevante para describir el estado de actividad microbiana durante la observación diaria. Aunque los demás parámetros se mantuvieron mayormente constantes o con cambios poco perceptibles, la producción de gas refuerza la tendencia observada previamente. Los reactores con los tratamientos "A" y "C" mostraron una producción de gas significativa durante los primeros 10 días, disminuyendo gradualmente hasta el día 15 llegando a ser inapreciable su producción diaria.

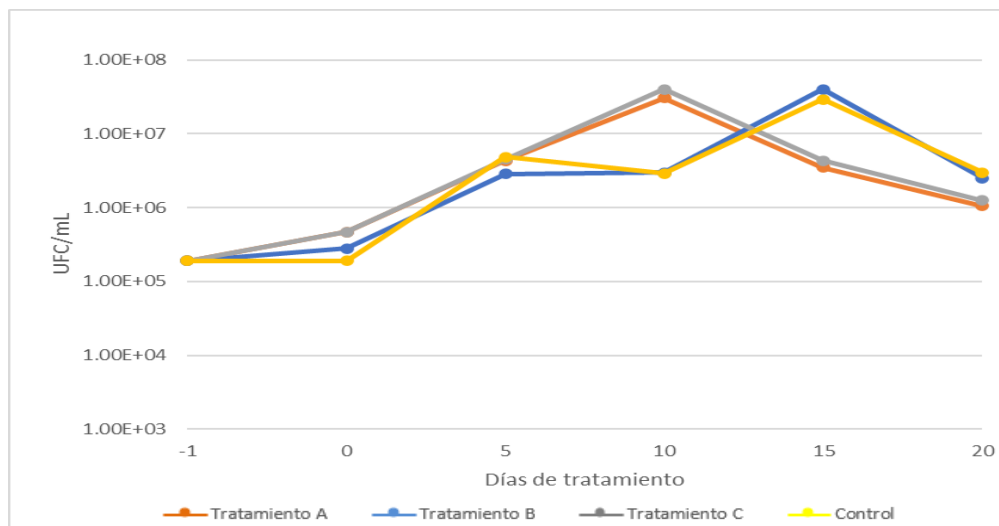
Por otro lado, la producción de gas para los reactores bajo los tratamientos "B" y "D", a pesar de ser altamente apreciable durante los primeros 10 días, sus picos de producción se llegaron a mostrar entre los días 10 y 15 de muestreo. Lo cual supone, un periodo tardío de estabilización del microbiota, lo cual tiene sentido al tomar en cuenta que la reducción más significativa de materia orgánica en ambos casos se da entre el día 15 y 20.

Figura 5

Curva de crecimiento de bacterias durante los días del experimento por tratamiento

**Figura 6**

Curva de crecimiento de levaduras durante los días del experimento por tratamiento



Conclusiones

Se definió un protocolo para la recuperación de microorganismos adaptados a las características de las aguas mieles, predominando dos grandes grupos compuestos por levaduras y bacterias ácido lácticas. La fase crítica del protocolo es la recuperación de estos consorcios a partir del residuo, manteniendo condiciones controladas para evitar la contaminación cruzada que afecte el pleno desarrollo de los grupos de interés. La fase de reproducción proporciona una mezcla de microorganismos eficientes en suspensión con un conteo de 1×10^8 UFC/mL.

La bio-aumentación no resultó ser un método eficiente para la reducción de carga orgánica en las aguas mieles. El agua residual cuenta con la cantidad suficiente de microorganismos para realizar la reducción máxima de carga orgánica a través de los tratamientos evaluados, siendo la principal limitante el tiempo de retención hidráulico.

La principal ventaja del proceso de bio-aumentación con microorganismos extraídos del residuo bajo estudio fue la reducción en el tiempo requerido para el tratamiento, lo cual puede favorecer el posterior diseño si se optimizan los requerimientos nutricionales para este consorcio.

La mezcla comercial de microorganismos no reporta un efecto en la reducción de la carga orgánica con respecto al control, ni una reducción en el tiempo de retención requerido para el tratamiento. Esto denota una baja capacidad de adaptación a las condiciones extremas del efluente y la competencia que enfrenta contra el consorcio de microorganismos presente en el residuo.

Recomendaciones

Evaluar esta metodología excluyendo a los microorganismos comerciales e incluyendo enzimas que propicien la digestibilidad del medio para evaluar incrementos en la eficiencia de consumo que repercuta en valores de carga orgánica y tiempos de retención.

Evaluar la utilización del consorcio microbiano utilizado para el tratamiento de residuos con características similares al efluente tratado en esta investigación, dada la prolificidad y resistencia de las cepas recuperadas.

Evaluar bajo condiciones controladas potenciales microorganismos degradadores descritos en la literatura, mediante pruebas de resistencia y capacidad de degradar la materia orgánica presente en el medio; de tal forma que permita conformar un consorcio más completo, teniendo en cuenta los metabolitos generados por cada cepa para desarrollar un estado de simbiosis efectivo.

Desarrollar un protocolo para establecer pruebas de resistencia y efectividad para consumir o degradar el contaminante dentro del efluente para microorganismos recuperados de otros medios o sustratos.

Evaluar los procesos de bio-aumentación en combinación con la adición de micronutrientes identificados en la literatura para optimizar los procesos metabólicos de los microorganismos que conformen el consorcio a utilizar.

Referencias

- APHA. (2017). *Standard methods for the examination of water and wastewater* (23^a ed.).
- Bautista S. (2017). *Análisis de la sostenibilidad socioeconómica y ecológica de la producción de café en la zona de Marcala, Honduras* [Tesis]. Universidad Nacional de Costa Rica, Costa Rica. <http://hdl.handle.net/11056/18422>
- Blinová, L., Sirotiak, M., Bartošová, A. y Soldán, M. (2017). Review: Utilization of Waste From Coffee Production. *Research Papers Faculty of Materials Science and Technology Slovak University of Technology*, 25(40), 91–101. <https://doi.org/10.1515/RPUT-2017-0011>
- Calabrese, E. J. y Kostecki, P. T. (1992). *Principles and Practices for Petroleum Contaminated Soils*. Routledge. <https://doi.org/10.1201/9780203742198>
- Enden, J. y Calvert, K. (2010). Review of coffee waste water characteristics and approaches to treatment. https://www.researchgate.net/profile/ken-calvert/publication/238084098_review_of_coffee_wastewater_characteristics_and_approaches_to_treatment/links/58a4125c92851ce3473d7aa8/review-of-coffee-wastewater-characteristics-and-approaches-to-treatment.pdf
- Gamero, J. (2019). *Evaluación del efecto de los microorganismos eficaces (EM™) sobre la calidad de aguas mieles del beneficio húmedo del café (Coffea arabica L.)*. Universidad Nacional Agraria de la Selva. <http://repositorio.unas.edu.pe/handle/UNAS/1499>
- Haddis, A. y Devi, R. (2008). Effect of effluent generated from coffee processing plant on the water bodies and human health in its vicinity. *Journal of Hazardous Materials*, 152(1), 259–262. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.06.094>
- Ijanu, E. M., Kamaruddin, M. A. y Norashiddin, F. A. (2020). Coffee processing wastewater treatment: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Applied Water Science*, 10(1). <https://doi.org/10.1007/s13201-019-1091-9>
- Pires, J. F., Viana, D. C., Braga, R. A., Schwan, R. F. y Silva, C. F. (2021). Protocol to select efficient microorganisms to treat coffee wastewater. *Journal of Environmental Management*, 278(Pt 2), 111541. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111541>
- Rattan, S., Parande, A. K., Nagaraju, V. D. y Ghiwari, G. K. (2015). A comprehensive review on utilization of wastewater from coffee processing. *Environmental Science and Pollution Research International*, 22(9), 6461–6472. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4079-5>
- Roleda, M. Y. y Hurd, C. L. (2019). Seaweed nutrient physiology: application of concepts to aquaculture and bioremediation. *Phycologia*, 58(5), 552–562. <https://doi.org/10.1080/00318884.2019.1622920>
- Sutton, S. (2011). Measurement of microbial cells by optical density. *Journal of Validation Technology*, 17, Artículo 1, 46–49.
- Torres-Valenzuela, L. S., Sanín-Villarrea, A., Arango-Ramírez, A. y Serna-Jiménez, J. A. (2019). Caracterización fisicoquímica y microbiológica de aguas mieles del beneficio del café. *Revista ION*, 32(2), 59–66. <https://doi.org/10.18273/revion.v32n2-2019006>

- Wenderoth, D. F., Rosenbrock, P., Abraham, W. R., Pieper, D. H. y Höfle, M. G. (2003). Bacterial community dynamics during biostimulation and bioaugmentation experiments aiming at chlorobenzene degradation in groundwater. *Microbial Ecology*, 46(2), 161–176. <https://doi.org/10.1007/s00248-003-2005-8>
- Wilson, C., Lukowicz, R., Merchant, S., Valquier-Flynn, H., Caballero, J., Sandoval, J., Okuom, M., Huber, C., Brooks, T. D., Wilson, E., Clement, B., Wentworth, C. D. y Holmes, A. E. (2017). Quantitative and Qualitative Assessment Methods for Biofilm Growth: A Mini-review. *Research & Reviews. Journal of Engineering and Technology*, 6(4).

Anexos

Anexo A

Tablas de recolección de datos

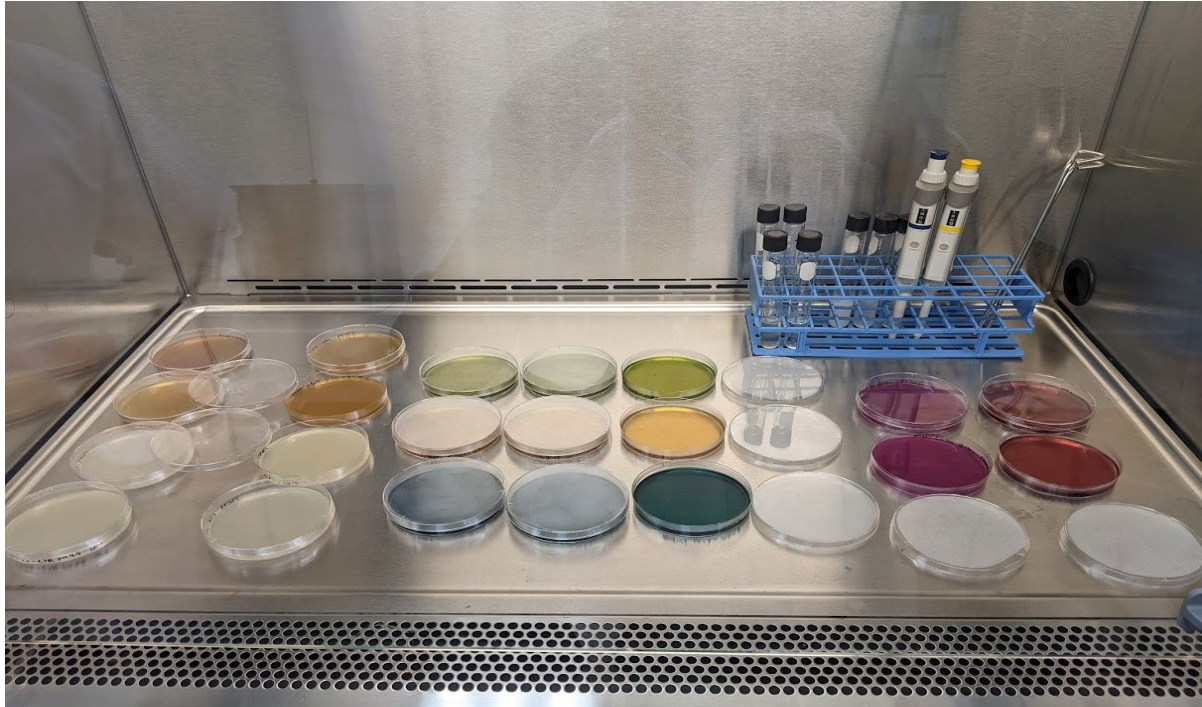
Extracción de aguas mieles		
Número de muestra		
Muestra		Comentarios
Fecha y hora		
Sitio de recolección		
Volumen extraído		
pH		
Temperatura		
Otras observaciones		

Medición en laboratorio para caracterización inicial y final		
Número de muestra		
Fecha, hora y lugar		
Muestra		Comentarios
Temperatura		
pH		
DQO		
Sólidos totales		
Sólidos volátiles		
Observaciones anómalas		

Medición durante los muestreos		
Código de la UE		
Muestra		Comentarios
pH		
Bacterias (UFC/mL)		
Levaduras (UFC/mL)		
Temperatura		
Observaciones anómalas		

Anexo B

Pruebas microbianas para realizar la bioprospección del medio



Anexo C*Crecimiento de bacterias ácido-lácticas y levaduras*

Anexo D*Montaje de reactores con agua residual de la producción de café*

Anexo E

Materia orgánica en crisoles posterior a la prueba de sólidos totales



Anexo F

Sólidos observados posterior a la prueba de sólidos volátiles

