

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias e Ingenierías

**Toxicidad de la cafeína en microorganismos presentes en el
tratamiento aeróbico de aguas residuales**

Proyecto de investigación

Andrea Priscila Chafra Bastidas

Ingeniería Ambiental

Trabajo de titulación presentado como requisito
para la obtención del título de
Ingeniera Ambiental

Quito, 23 de mayo de 2017

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ
COLEGIO DE CIENCIAS E INGENIERÍAS

**HOJA DE CALIFICACIÓN
DE TRABAJO DE TITULACIÓN**

**Toxicidad de la cafeína en microorganismos presentes en el tratamiento
aeróbico de aguas residuales**

Andrea Priscila Chafra Bastidas

Calificación:

Nombre del profesor, Título académico

Valeria Ochoa-Herrera, Ph.D.

Firma del profesor

Quito, 23 de mayo de 2017

Derechos de Autor

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma del estudiante:

Nombres y apellidos:

Andrea Priscila Chafla Bastidas

Código:

00106916

Cédula de Identidad:

0604882787

Lugar y fecha:

Quito, mayo de 2017

RESUMEN

El tratamiento biológico de aguas residuales es una alternativa costo-efectiva para degradar la materia orgánica y contribuir al cuidado y protección de los recursos hídricos. Estudios recientes han revelado que la cafeína, 1,3,7-trimethylxanthine, es una sustancia psicoactiva con mayor presencia en el agua residual derivada de actividades antropogénicas. Por este motivo es de suma importancia analizar el efecto de los contaminantes emergentes tales como la cafeína presentes en el agua residual durante los procesos biológicos de tratamiento de estos efluentes. El objetivo de la presente investigación es evaluar la toxicidad microbiana de la cafeína en los microorganismos presentes en lodos aeróbicos provenientes de una planta piloto de tratamiento de aguas residuales (PTAR) de la ciudad de Quito durante la degradación aeróbica de la glucosa. Los lodos provenientes licor mezcla de un reactor biológico de una PTAR de Quito demostraron ser el mejor inóculo microbiano evaluado con una relación de SSV/SST de 71.8% y una actividad máxima específica de consumo de glucosa de 3263.52 mg glucosa g SSV¹ d⁻¹. En los bioensayos batch de degradación de glucosa bajo condiciones aeróbicas por un cultivo microbiano enriquecido se determinó que la cafeína no generó un efecto inhibitorio en concentraciones de hasta 25 mg L⁻¹. La concentración de cafeína que generó 20, 50 y 80% de inhibición en la actividad metabólica de degradación de la glucosa IC₂₀, IC₅₀ e IC₈₀ fue 20, 75 y mayor a 100 mg L⁻¹, respectivamente. En base a estos resultados se puede concluir que no se espera un efecto inhibitorio de la cafeína en concentraciones registradas en aguas residuales municipales generadas en la ciudad de Quito.

Palabras clave: Cafeína, toxicidad microbiana, inhibición, lodos activados, glucosa

ABSTRACT

Biological wastewater treatment is a cost-effective alternative to degrade organic matter and contribute to the protection of hydric sources. Recent studies have shown that caffeine, 1,3,7-trimethylxanthine, is a psychoactive substance with major presence in wastewaters, derivate from anthropogenic activities. By this reason, it is of vital importance to analyze the effects of emerging compounds like caffeine, present in wastewaters during biological treatment of effluents. The objective of this study is to evaluate microbial toxicity of caffeine in the microorganisms that are present in the aerobic sludge from the pilot wastewater treatment plant (PTAR) in Quito city, during glucose degradation. The sludge coming from the mix liquor of a biological reactor of a PTAR in Quito demonstrated to be the best microbial inoculum evaluated with a 71.8% VSS/TSS relation, and a 3263.52 mg glucose g VSS¹ d⁻¹ specific rate of glucose utilization. The batch glucose degradation under aerobic conditions by enriched microbial culture bioassays determined that caffeine had no inhibitory effect in concentrations until 25 mg L⁻¹. Caffeine concentrations that caused 20, 52 and 80% inhibition in the metabolic activity of glucose degradation, IC₂₀, IC₅₀ e IC₈₀, were 20, 75 and over 100 mg L⁻¹, respectively. With these results, it might be conclude that no inhibitory effect of caffeine at the registered concentrations in municipal wastewaters generated in Quito city will present an inhibitory effect.

Key words: Caffeine, microbial toxicity, inhibition, activated sludge, glucose

TABLA DE CONTENIDO

1.Introducción	9
2.Métodos y materiales	14
2.1 Reactivos químicos.....	14
2.2 Lodos.....	14
2.3 Medio basal mineral.....	15
2.4 Cultivo microbiano enriquecido.....	16
2.5 Bioensayos.....	17
2.5.1 Actividad máxima específica de consumo de glucosa.....	17
2.5.2 Toxicidad microbiana en presencia de cafeína a diferentes concentraciones.....	18
2.6. Métodos analíticos	19
2.6.1 Sólidos Suspendidos Totales (SST) y Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV).....	19
2.6.2 Actividad máxima de consumo de glucosa	20
3.Resultados y discusión	22
3.1 Mediciones in-situ en la PTAR piloto.....	22
3.2 Caracterización de inóculos microbianos aeróbicos.....	24
3.2.1 Caracterización físico-química.....	24
3.2.2 Caracterización biológica.....	25
3.2.4 Toxicidad Microbiana.....	30
4.Conclusiones	38
5.Referencias bibliográficas	39

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición de los bioensayos batch para determinación de toxicidad de cafeína en varios tratamientos (TC) en función de un control abiótico (CA) y un control biótico (CB).....	18
Tabla 2. Estándares para la construcción de la curva de calibración de glucosa a partir de una solución madre de 100 mg L ⁻¹ con fenol al 5% y ácido sulfúrico.....	21
Tabla 3. Mediciones <i>in-situ</i> para cada uno de los reactores en la PTAR piloto de Quito ubicada en las instalaciones de la EPMAPS, en la descarga del colector central Iñaquito “Batán”	24
Tabla 4. Sólidos suspendidos totales, sólidos suspendidos volátiles y su relación determinada de las muestras de lodo tomadas en los diferentes puntos en la PTAR piloto de Quito ubicada en las instalaciones de la EPMAPS, en la descarga del colector central Iñaquito “Batán”.....	25
Tabla 5. Actividad máxima específica de consumo de glucosa y porcentaje de actividad determinado de los tres lodos muestreados (RAS), (LM), (LA) de la planta piloto de tratamiento de aguas residuales de Quito, ubicada en las instalaciones de la EPMAPS, en la descarga del colector central Iñaquito “Batán” en presencia de un inóculo microbiano de 5% (v/v) y glucosa como sustrato o fuente de carbono (1000 mg L ⁻¹).....	29
Tabla 6. Actividad máxima específica de consumo de glucosa, porcentaje de actividad y porcentaje de inhibición en el consorcio microbiano proveniente del licor mezcla (LM) de la PTAR piloto de Quito por la presencia de cafeína ubicada en las instalaciones de la EPMAPS, en la descarga del colector central Iñaquito “Batán” en presencia de un inóculo microbiano de 5% (v/v) y glucosa (1000 mg L ⁻¹).....	35
Tabla 7. Efecto inhibitorio de la cafeína en los microorganismos presentes en el consorcio microbiano de 5% (v/v) proveniente del licor mezcla (LM) de la PTAR piloto de Quito. IC ₂₀ , IC ₅₀ , IC ₈₀ son las concentraciones de cafeína causantes del 20, 50 y 80% de inhibición en la actividad de los microorganismos estudiados.....	36
Tabla 8. Actividad máxima específica de consumo de glucosa, porcentaje de actividad y porcentaje de inhibición en el consorcio microbiano de 5% (v/v) proveniente del licor mezcla (LM) de la PTAR piloto de Quito por la presencia de cafeína a bajas concentraciones.....	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diseño del funcionamiento y operación de la planta piloto de tratamiento de aguas residuales del Distrito Metropolitano de Quito ubicada en las instalaciones de la EPMAPS, en la descarga del colector central Iñaquito “Batán”. Leyenda: (*) punto de toma de muestras de lodos.16

Figura 2. Curvas de crecimiento microbiano en función del tiempo del consorcio microbiano presente en los lodos muestreados en la PTAR piloto de Quito en bioensayos realizados con 5% (v/v) de inóculo microbiano y 3000 mg L⁻¹ glucosa como sustrato o fuente de carbono. Leyenda: (□) Control abiótico (CA), (■) Lodos de recirculación (RAS), (●) Lodos licor mezcla (LM) y (▲) Lodos anóxicos (LA). Las barras de error (más largas que los símbolos) representan la desviación estándar de los ensayos por triplicado.....27

Figura 3. Degradación de glucosa en función del tiempo por acción de consorcios microbianos presentes en los diferentes lodos muestreados en la PTAR piloto de Quito en bioensayos realizados con 5% (v/v) de inóculo microbiano y 3000 mg L⁻¹ de glucosa como sustrato o fuente de carbono (3000 mg L⁻¹). Leyenda: (□) Control abiótico (CA), (■) Lodos de recirculación (RAS), (●) Lodos licor mezcla (LM) y (▲) Lodos anóxicos (LA). Las barras de error (más largas que los símbolos) representan la desviación estándar de los ensayos por triplicado.....30

Figura 4. Degradación de glucosa en función del tiempo por acción de un consorcio microbiano 5% (v/v) de la muestra del licor mezcla (LM) de la PTAR piloto de Quito en presencia de 1000 mg glucosa L⁻¹ y un incremento en concentraciones de cafeína en (mg L⁻¹): (●) 0, (□) 100, (◇) 10, (◆) 25, (—) 50, (— - —) 75 y, (▲) 100. Las barras de error (más largas que los símbolos) representan la desviación estándar de los ensayos por triplicado...34

Figura 5. Efecto inhibitorio del incremento en la concentraciones de cafeína en la actividad máxima específica de consumo de glucosa en un consorcio microbiano 5% (v/v) obtenido del licor mezcla (LM) de la PTAR piloto de Quito en (mg L⁻¹). Las barras de error (más largas que los símbolos) representan la desviación estándar de los ensayos por triplicado.....35

Figura 6. Degradación de glucosa en función del tiempo por acción de un consorcio microbiano 5% (v/v), obtenido de la muestra del licor mezcla (LM) de la PTAR piloto de Quito en presencia de 1000 mg glucosa L⁻¹ y bajas concentraciones de cafeína en (mg L⁻¹): (●) 0, (□) 10, (●●) 1, (—) 2.5, (▲) 5 y (◆) 10. Las barras de error (más largas que los símbolos) representan la desviación estándar de los ensayos por triplicado.....37

1. INTRODUCCIÓN

El consumo del agua se ha incrementado drásticamente en los últimos 50 años por diversas actividades humanas como la agricultura, la industria y las actividades domésticas; y por el crecimiento demográfico (NGWA, 2012). El agua contaminada que resulta luego de ser utilizada en actividades domésticas, comerciales e industriales se la denomina agua residual. Las aguas residuales se caracterizan por su contenido de materia orgánica, nutrientes, patógenos y/o por la presencia de sustancias antropogénicas contaminantes o tóxicas (Espígares et al., 1985).

Las aguas residuales domésticas constituyen uno de los problemas ambientales más importantes en países en vías de desarrollo ya que en su mayoría son descargadas en cuerpos de agua dulce sin tratamiento previo alguno, afectando al medio ambiente y a la salud pública (Rheingans, 2006). Se estima que la contaminación de agua potable causa más de 502,000 muertes por año a nivel mundial (OMS, 2016). El tratamiento biológico de las aguas residuales constituye una tecnología costo-efectiva que contribuye a la estabilización de la materia orgánica, remoción de sólidos y patógenos, además de promover la recuperación y conservación de los recursos hídricos del planeta (Metcalf et al., 2014)

El tratamiento biológico del agua residual bajo condiciones aeróbicas ocurre en presencia de aire y utiliza microorganismos denominados aeróbicos, estrictos o facultativos; que son aquellos microorganismos que utilizan oxígeno molecular como aceptor de electrones para asimilar compuestos orgánicos convirtiéndolos en dióxido de carbono, agua y biomasa (Mittal, 2011).

Entre los principales procesos de tratamiento aeróbico destaca el proceso convencional de lodos activados, el cual es el más común y ampliamente utilizado para tratar aguas residuales municipales e industriales. En términos generales, este proceso incluye un tanque de aireación y un clarificador secundario. En el tanque aireación, la biomasa consume la materia orgánica soluble y en el caso de sistemas con aireación extendida adicionalmente el amonio se transforma en nitrato (ADI,2016). En el clarificador secundario, el efluente es separado en dos fases, agua clarificada y biomasa. La biomasa o los lodos son recirculados al tanque de aireación o también pueden ser deshidratados (ADI, 2016). El tanque de aireación posee un difusor de aire que provee el oxígeno requerido por los microorganismos y mantiene en constante mezcla al reactor (Mittal, 2011). El sedimentador o clarificador secundario tiene como propósito remover la materia orgánica biodegradable y los sólidos suspendidos hasta con 90% de eficiencia (Metcalf et al., 2014).

En la actualidad existe un creciente interés por los compuestos contaminantes emergentes ya que por su origen, naturaleza y concentración, su presencia en el ambiente ha pasado inadvertida pese a generar contaminación y potenciales riesgos a la salud humana y a los ecosistemas (EPA, 2016). Según la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos, USEPA, un compuesto emergente es aquel compuesto químico que no tiene regulación ambiental (EPA, 2016). Entre los compuestos emergentes presentes en las aguas residuales domésticas se encuentran sustancias como la cafeína, antibióticos, sustancias psicotrópicas, entre otros.

Estudios de la literatura reportan que la cafeína, 1,3,7-trimethylxanthine, es una de las sustancias psicoactivas típicamente presente en el agua residual municipal derivada de actividades antropogénicas, ya que se consume diariamente en forma de té,

café, otras bebidas y chocolate; además de formar parte de ciertos medicamentos y del tabaco. Se estima que una persona consume en promedio entre 80-400 mg de cafeína por día (Peeler et al., 2006). A nivel global, la presencia de cafeína en el ambiente está directamente relacionada con la descarga de aguas residuales municipales (Martín et al., 2012).

En Ecuador, Voloshenko-Rossin y colaboradores realizaron un estudio en la cuenca de río Esmeraldas, a lo largo de los ríos San-Pedro-Guayllabamba-Esmeraldas, incluyendo el análisis de cuatro corrientes de agua residual que contaminan el río San Pedro (Voloshenko-Rossin et al., 2015). Dicho estudio determinó la concentración de varios contaminantes emergentes en los ríos en cuestión; reportando la mayor concentración de cafeína, de $5,597 \pm 5,077 \text{ ng L}^{-1}$ en el río Machángara Norte (Voloshenko-Rossin et al., 2015).

Las descargas continuas de efluentes no tratados pueden llegar a causar un efecto inhibitorio en microorganismos presentes en los sistemas biológicos de tratamiento de aguas residuales (Thangaraj et al., 2013). Dicho efecto puede disminuir ya sea por acción de degradación microbiana o sorción. Varias investigaciones han confirmado que existe un alto rango de remoción de cafeína por acción de microorganismos propios de PTARs, Voloshenko-Rossin y colaboradores mencionan un alcance de remoción de 97% de cafeína en PTARs, (Voloshenko-Rossin et al., 2015). En otras investigaciones se ha reportado que microorganismos de los géneros *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Aspergillus* y *Serratia* tienen la habilidad de degradar cafeína con una eficiencia de hasta el 92% ya que utilizan la cafeína como única fuente de carbono, nitrógeno y energía para su crecimiento. Las bacterias *Pseudomonas* registraron la tasa de crecimiento más alta, con una capacidad de degradación de

cafeína de 90 mg h^{-1} (Ahmad, 2014). Así mismo en un estudio realizado mediante ensayos batch en los efluentes de una industria cafetera, microorganismos del tipo *Trichosporon asahii* removieron la cafeína presente en aguas residuales con eficiencias entre 75 y 80% en un periodo de 48 horas, dato determinado en función de la habilidad de formación de biofilm de dicha especie. (Lakishmi, 2014).

Por otra parte, la presencia de cafeína en aguas residuales a ser tratadas puede afectar los procesos de biodegradación. Varios estudios han demostrado que la cafeína en altas concentraciones afecta la tasa de crecimiento de *E. coli* (Thangaraj et al., 2013) e inhibe el crecimiento de otras especie microbianas cuando las concentraciones de cafeína son iguales o superiores a $1029.21 \text{ mg L}^{-1}$ (Gaula et al., 2015). AL-Janabi en su estudio de toxicidad microbiana de la cafeína a varias cepas microbianas determinó que *B subtilis* and *Salmonella typhi* inhiben su crecimiento en presencia 5000 mg L^{-1} de cafeína (AL-Janabi, 2011). Contradiendo estos estudios Dash y colaboradores determinaron mediante una serie de ensayos bajo condiciones aeróbicas, con un medio que contenía 1.2 g L^{-1} de cafeína que *Pseudomonas sp.* no presenta inhibición en presencia de la cafeína. En dicho estudio se determinó que esta especie es capaz de mantener su crecimiento pese a la presencia de cafeína, en función del peso seco de las células, y más aún que estas bacterias son consideradas degradadoras de cafeína, ya que se ha determinado su habilidad para degradar la misma usándola como fuente de nutrientes y potenciar de tal manera su crecimiento (Dash et al., 2009).

La IC, concentración inhibitoria, es la concentración de un agente externo, la cual es capaz de inhibir de manera visible el crecimiento o actividad de los microorganismos, es decir la concentración que presenta efectos tóxicos en microorganismos (Andrews, 2012). Las ICs son determinadas mediante bioensayos y constituyen un importante

indicador en el establecimiento de los parámetros de diseño de un determinado sistema de tratamiento biológico (Andrews, 2012). Ochoa y colaboradores determinaron a IC_{20} , IC_{50} e IC_{80} como aquellas concentraciones del agente inhibidor que reducen la actividad metabólica de los microorganismos en un 20, 50 y 80% respectivamente en relación a un control no inhibido, mediante ensayos en presencia de cobre, el cual actúa como agente inhibidor en varios grupos tróficos microbianos responsables de la remoción de materia orgánica y nutrientes en los procesos de tratamiento de aguas residuales (Ochoa et al., 2011).

En este contexto, el objetivo de este estudio es evaluar la toxicidad de la cafeína en los microorganismos presentes en lodos aeróbico provenientes de una planta piloto de tratamiento de aguas residuales (PTAR) de Quito durante la degradación de la glucosa.

2. MÉTODOS Y MATERIALES

2.1 Reactivos químicos

Ácido sulfúrico (H_2SO_4) (96 % pureza), cloruro de amonio (CH_4Cl) (98%), cloruro de calcio (CaCl_2) (XX%), fenol ($\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$) (95%), fosfato dihidrógeno de potasio (KH_2PO_4) obtenidos de Judex Laboratory (Sudbury Middlesex, England). Fosfato dipotásico (K_2HPO_4) (99 %) y sulfato de magnesio (MgSO_4) (99.9%) obtenidos de Reactivos H.V.O (Quito, Ecuador). Glucosa ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) (99%) y cafeína ($\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_2$) (96%) fueron obtenidas de Global Chemie (Quito, Ecuador). Extracto de levadura (99%) fue obtenida de Bacto Difco laboratorios (Quito, Ecuador). Todos los reactivos fueron utilizados en el estado en que fueron recibidos.

2.2 Lodos

Las muestras de lodos fueron obtenidas de la planta piloto de tratamiento de aguas residuales (PTAR) del Distrito Metropolitano de la ciudad de Quito. Esta planta piloto forma parte del programa de descontaminación de ríos del Distrito Metropolitano de Quito ejecutado por la Empresa Pública Metropolitana de Agua Potable y Saneamiento (EPMAPS) ubicada en las instalaciones de la EPMAPS en la descarga del colector central Ñaquito "Batán". El principal objetivo de esta planta es obtener parámetros de operación definitivos para la planta de tratamiento de aguas residuales de Quitumbe (EPMAPS, 2016), la cual fue inaugurada en el año 2016 y entró en funcionamiento el 8 de Febrero del 2017 (La Prensa, 2017). El agua residual ingresa a la planta de tratamiento con un caudal de 2.6 L min^{-1} mediante una bomba de succión para regular al mismo. Posteriormente pasa por una sección de pre-tratamiento constituida por una etapa cribado, continuando a un tanque de

ecualización, para posteriormente ingresar a al tanque anóxico 1, seguido de los tanques anóxicos 2 y 3. El agua residual continúa su curso por un tanque aerobio 1, seguido del tanque aerobio 2 para llegar hasta un tanque anóxico 4, desde el cual se recircula lodos al tanque anóxico 2. Del tanque anóxico 4 pasa finalmente a un sedimentador secundario el cual recircula lodos al tanque anóxico 1. El objetivo de la PTAR piloto es alcanzar eficiencias de remoción de materia orgánica de alrededor de un 85% (EPMAPS, 2016). En la Figura 1 se presenta un diseño del funcionamiento y operación de la PTAR piloto. Las muestras de lodo fueron extraídas de tres puntos diferentes mostrados en la Figura 1: 1) lodos recirculados desde el sedimentador secundario (RAS); 2) lodos del licor mezcla, recirculado del tanque anóxico 4 (LM), y 3) lodos sedimentados, es decir lodos del tanque Anóxico 2 (LA). Los parámetros *in-situ* como pH y conductividad fueron proporcionados por personal técnico de la EPMAPS.

2.3 Medio basal mineral

La composición del medio basal mineral (en mg L^{-1}) fue: NH_4Cl (280), K_2HPO_4 (250), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (100), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (13.27), extracto de levadura (10), KH_2PO_4 (2050). Adicionalmente se añadió 1mL L^{-1} de solución traza, la cual contiene (en mg L^{-1}): H_3BO_3 (50), $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (2000), ZnCl_2 (50), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (50), $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (50), $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (90), $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (2000), $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (50), $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (30), $\text{NaSeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (100), EDTA (1000), resarzurina (200) y finalmente 1mL L^{-1} 36% HCl . El pH del medio fue ajustado a un valor entre 7.1-7.3 utilizando NaOH concentrado.

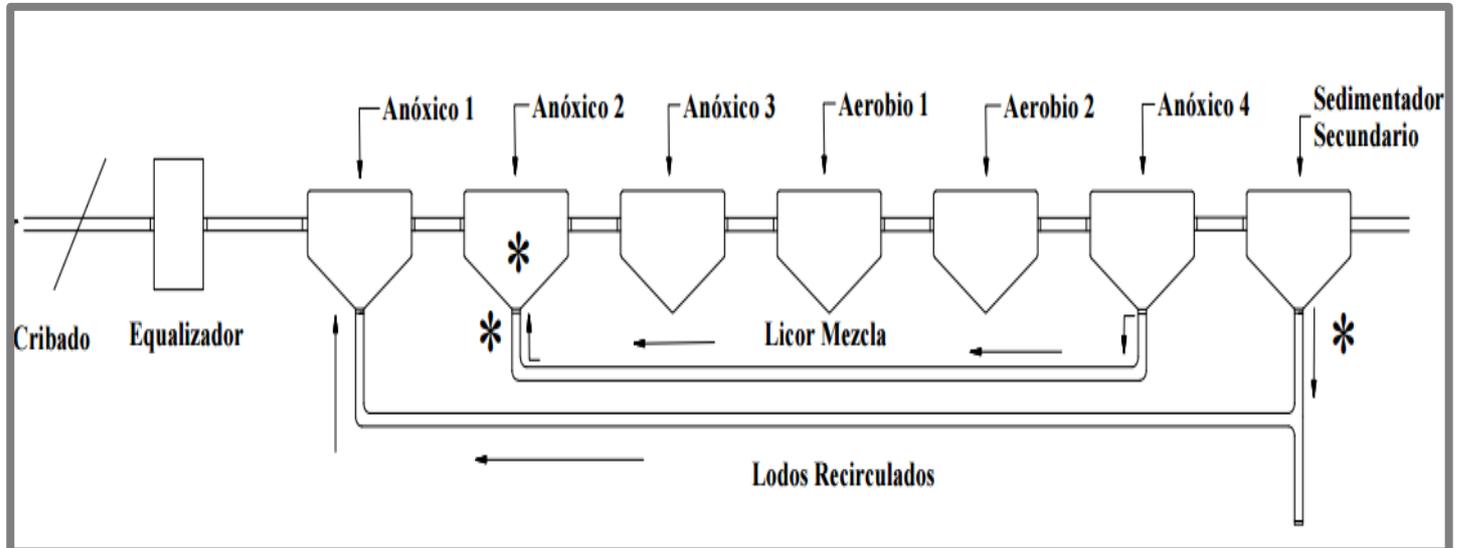


Figura 1. Diseño del funcionamiento y operación de la planta piloto de tratamiento de aguas residuales del Distrito Metropolitano de Quito ubicada en las instalaciones de la EPMAPS, en la descarga del colector central Iñaquito “Batán”. Leyenda: (*) punto de toma de muestras de lodos. Elaborado por Priscila Chafla

2.4 Cultivo microbiano enriquecido

Experimentos Batch o por lotes fueron realizados por triplicado para cada tipo de lodo en matraces erlenmeyers de vidrio de 125 mL de capacidad. Los bioensayos de tratamientos fueron realizados con un volumen conocido de medio basal mineral (90-100 mL), inóculo microbiano de 5% (v/v) y glucosa como sustrato o fuente de carbono (3000 mg L⁻¹). De la misma manera, controles abióticos (CA) fueron desarrollados (ausencia de inóculo microbiano) por triplicado con las mismas cantidades de medio basal mineral y glucosa. Los flascos erlenmeyers fueron cubiertos con algodón para facilitar la difusión del oxígeno del aire hacia la solución acuosa. Todos los flascos erlenmeyers fueron colocados en una

incubadora MaxQ 4000 (Barnstead Lab-Line, USA) a 30 ± 1 C con agitación constante durante 24 horas en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito. Una muestra de cada bioensayo fue tomada cada dos horas para evaluar el crecimiento microbiano a través de la medición de la densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm. La determinación de la densidad óptica se realizó empleando un colorímetro Spectronic 20D+ (Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA) en el Laboratorio de Ingeniería Ambiental de la Universidad San Francisco de Quito (LIA-USFQ).

2.5 Bioensayos

2.5.1 Actividad máxima específica de consumo de glucosa

Experimentos Batch fueron realizados para determinar la actividad máxima específica de consumo de glucosa. Los bioensayos fueron realizados por triplicado en erlenmeyers de 125 mL con 95-100 mL de medio basal mineral, 1000 mg glucosa L⁻¹ y 5% (v/v) de un cultivo microbiano enriquecido previamente preparado. De igual manera se preparó por triplicado controles abióticos usando sólo medio basal con glucosa sin adición de cultivo enriquecido. Todos los ensayos fueron cubiertos con algodón para facilitar el transporte de oxígeno. Los ensayos fueron colocados en una incubadora a una temperatura de 30 ± 1 °C con agitación constante durante un periodo de 12 horas aproximadamente. Durante este período, las muestras de cada uno de los ensayos fueron recolectadas en intervalos de dos horas para determinar el consumo de glucosa empleando una curva de calibración construida a partir de una solución madre de 100 mg glucosa L⁻¹.

El porcentaje de actividad máxima específica de consumo de glucosa (%ACT) para cada uno de las muestras de lodo evaluadas en este estudio fue calculada a partir de la

pendiente la curva de consumo de glucosa con respecto al tiempo, con el objetivo de establecer el mejor inóculo microbiano (Ochoa et al., 2011).

2.5.2 Toxicidad microbiana en presencia de cafeína a diferentes concentraciones

Ensayos Batch fueron realizados para evaluar la toxicidad microbiana de la cafeína en diferentes concentraciones en los microorganismos presentes en los lodos de la PTAR piloto. Los controles bióticos fueron desarrollados empleando 90-100 mL de medio basal mineral, 1000 mg L⁻¹ glucosa y 5% (v/v) de un cultivo previamente enriquecido. Los bioensayos tratamiento para evaluar el efecto de la cafeína fueron realizados añadiendo diferentes concentraciones de cafeína en un rango alto: 10, 25, 50, 75 y 100 mg L⁻¹, y una serie de concentraciones de rango inferior: 1, 2.5, 5 y 10 mg L⁻¹ preparadas a partir de una solución madre de cafeína de 1000 mg L⁻¹ con un volumen final de 100 mL en cada uno de los bioensayos. De igual manera se prepararon controles bióticos (CB) y abióticos (CA). Los controles bióticos (CB) se realizaron en ausencia de cafeína, y los abióticos en ausencia de microorganismos. En la Tabla 1 se presenta información sobre el montaje de los bioensayos para la determinación de la toxicidad de la cafeína.

Tabla 1. Composición de los bioensayos batch para determinación de toxicidad de cafeína en varios tratamientos (TC) en función de un control abiótico (CA) y un control biótico (CB)

Ensayos	Medio basal mineral	Glucosa	Microorganismos	Cafeína
Control Abiótico (CA)	X	X		X
Control Biótico (CB)	X	X	X	
Tratamientos con cafeína (TC)	X	X	X	X

Una vez preparados los bioensayos, los matraces erlemeyer fueron tapados con algodón para regular el paso de oxígeno y evitar la contaminación con otros microorganismos ambientales presentes en el aire. Los ensayos fueron realizados en una incubadora con agitación constante a una temperatura de $30 \pm 1^\circ\text{C}$ durante un periodo de 12 horas aproximadamente en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito; período durante el cual muestras de cada uno de los erlenmeyers fueron colectadas en intervalos de dos horas.

Posteriormente, se determinó el efecto inhibitorio de las diferentes concentraciones de cafeína en los bioensayos empleando la ecuación 1. Para ello, se calculó la actividad máxima específica de consumo de glucosa en función de la pendiente de consumo de la misma expresada en mg glucosa consumida $\text{g SSV}^{-1} \text{d}^{-1}$. En cada caso la actividad máxima específica a concentraciones establecidas de cafeína fue determinada en los intervalos de tiempo en donde el control biótico (CB) presentaba su actividad específica máxima (Ochoa et al., 2011).

Ec.1

$$\%E.inhibitorio = 100 - \left(\frac{Act.máx\ específica\ concentración\ evaluada}{Acti.máx\ específica\ del\ control\ biótico} * 100 \right)$$

A partir de estos resultados, se calcularon los valores de IC_{20} , IC_{50} e IC_{80} que representan las concentraciones del inhibidor que reduce la actividad de consumo de glucosa en 20, 50 y 80%, respectivamente (Ochoa et al., 2011). Estos valores fueron calculados mediante la interpolación en el gráfico establecido del porcentaje de inhibición observada en el eje de las ordenadas en función de la concentración del inhibidor en el eje de las abscisas (Ochoa et al., 2011).

2.6. Métodos analíticos

2.6.1 Sólidos Suspendidos Totales (SST) y Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV)

Los SST fueron calculados empleando el método SM2540 B del protocolo de métodos normalizados para el análisis de Aguas Potables y Residuales y el método SM2540 E para determinar los SSV (APHA, 1998). El análisis de SST se realiza por triplicado colocando 20 mL de los diferentes lodos en crisoles y colocándolos en el horno a 105°C durante 8 horas para posteriormente determinar la diferencia en peso usando una balanza analítica. De igual manera para los SSV, los lodos ya secados se los colocó en la mufla a 550 °C durante 3 horas para posteriormente determinar el peso de las muestras (APHA, 1998)

2.6.2 Actividad máxima de consumo de glucosa

Las diferentes concentraciones de glucosa de los bioensayos fue determinada empleando un método colorimétrico desarrollado por Dubois y colaboradores (Valarezo, 2010) utilizando una solución de fenol al 5% y una solución madre de glucosa de 100 mg L⁻¹. A partir de estas dos soluciones se prepararon estándares de concentraciones conocidas de glucosa (ver Tabla 2), se generó una curva de calibración y se obtuvo la ecuación de la regresión lineal a partir de las cuales se estimó las concentraciones de glucosa en el curso de los diferentes bioensayos.

La concentración presente de glucosa fue determinada tomando 1 mL de muestra de cada uno de los bioensayos a distintos intervalos de tiempo. Las muestras fueron sometidas a centrifugación durante 10 minutos a 1000 r.p.m. en una micro centrifuga (Labnet, NJ, USA). 0.5 mL de sobrenadante fue transferido a vasos de precipitación para realizar diluciones de tal manera que las concentraciones obtenidas se encuentren dentro del rango de la curva de calibración. La mezcla compuesta de 0.5 mL de la muestra diluida, 0.5 mL de

fenol y 2.5 mL de H_2SO_4 fue colocada en el horno a 55°C durante 10 minutos. Una vez las muestras se enfriaron, se determinó la concentración de glucosa con ayuda del colorímetro Spectronic 20D+ (Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA) a una longitud de onda de 490 nm en el Laboratorio de Ing. Ambiental de la Univesidad San Francisco de Quito (LIA-USFQ).

Tabla 2. Estándares para la construcción de la curva de calibración de glucosa a partir de una solución madre de 100 mg L^{-1} con fenol al 5% y ácido sulfúrico.

No.	100 mg glucosa L^{-1} (mL)	H_2O (mL)	Estándares (mL)	Fenol (mL)	H_2SO_4 (mL)	Total (mL)
1	0	0.5	0.5	0.5	2.5	3.5
2	0.1	0.4	0.5	0.5	2.5	3.5
3	0.2	0.3	0.5	0.5	2.5	3.5
4	0.3	0.2	0.5	0.5	2.5	3,5
5	0.4	0.1	0.5	0.5	2.5	3.5
6	0.5	0.0	0.5	0.5	2.5	3.5

3. Resultados y Discusión

3.1 Mediciones in-situ en la PTAR piloto

En la Tabla 3 se presentan los parámetros in situ proporcionados en la PTAR piloto de la ciudad de Quito, los cuales fueron medidos el día de toma de muestras de lodos de la PTAR.

Las aguas residuales municipales presentan valores de pH entre 7 (bajo) y 8.5 (alto), con un valor medio de pH de 7.5 (Almeida et al., 2000). El pH del agua de la descarga colector central “Iñaquito” (8.34) se encuentra dentro del rango mencionado con un valor de pH relativamente alto para aguas residuales domésticas. En los demás reactores, tanto en los anóxicos como en los aerobios y el sedimentador secundario se observa una reducción en pH; en los reactores anóxicos 1, 2, 3 y 4 se presentan valores de 7.50, 7.06, 6.81 y 6.82 respectivamente, así mismo en los reactores aerobios 1 y 2 se presentan pH de 6.90 y 9.85, respectivamente, finalmente en el sedimentador secundario se presenta un valor de pH de 6.87 lo cual probablemente se debe a la respiración aeróbica microbiana ya que en presencia de una fuente de orgánica de carbono que reacciona con oxígeno diatómico, O_2 se genera dióxido de carbono, CO_2 , y agua, H_2O , el dióxido de carbono se disuelve en el agua formando ion bicarbonato (Jurtshuk, 1996). Los datos de temperatura

por su parte reportan un valor de 17.9°C en el afluente de la PTAR y valores oscilantes entre 16.4 y 16.6 °C en los reactores aeróbicos. Como era de esperarse la temperatura del afluente en la PTAR piloto es mayor a aquellas presentes en los diversos reactores, ya que se trata de un punto de descarga de aguas residuales domésticas, las cuales comúnmente se encuentran a mayores temperaturas. Por su parte el rango de temperaturas presente en los reactores aeróbicos se los puede considerar valores un poco bajos ya que según literatura una temperatura típica en este tipo de reactores es de 20°C (FESTO, 2015). Así mismo la diferencia de temperatura común entre el agua residual que ingresa y aquella en el reactor se considera es de 0.5 a 1 °C, (Makinia et al., 2005). Esta dinámica de temperatura puede afectar la actividad microbiana así como las propiedades fisicoquímicas del licor mezcla en los sistemas de lodos activados (Makinia et al., 2005).

Los valores de OD presentados en el reactor aerobio 1 y aerobio 2 corresponden a los valores de 2.17 y 2.31 mg L⁻¹, respectivamente. El rango de OD considerado óptimo en este tipo de plantas es de 2-3 mg L⁻¹(Wilén et al., 1999), por lo cual los valores de OD presentados en este estudio pueden ser considerados propios de PTARs.

En términos de la turbidez el valor crudo medido es de 109.83 NTU y el valor en el efluente es de 6.05 NTU, lo cual indica una clara reducción de la misma, esta propiedad es atribuida a la dificultad del agua para transmitir la luz debido a los materiales suspendidos en la misma (Metcalf et al., 2014). Lo que quiere decir que una reducción en los sólidos suspendidos genera una reducción en la turbidez que es lo que se espera obtener durante el proceso de tratamiento del agua residual.

La sedimentación de lodos en conos Imhoff presenta valores de 120 y 100 mL de sedimentación de los mismos durante un lapso de 30 minutos. En la literatura se han reportado diversos valores para este tipo de mediciones entre los cuales se puede

mencionar el de Bodog en el que se reporta un valor de 20 mL durante un periodo de dos horas (Bodog et al., 2010), esta variación en la sedimentación puede depender principalmente de las características de tales partículas; si son partículas discretas o partículas floculantes y si la concentración de las mismas en suspensión, es diluida o concentrada (Metcalf et al., 2014). Así mismo va a tener relación directa con el flujo del caudal y el tiempo de retención de los reactores (Bodog et al., 2010).

Tabla 3. Mediciones *in-situ* para cada uno de los reactores en la PTAR piloto de Quito ubicada en las instalaciones de la EPMAPS, en la descarga del colector central Iñaquito “Batán”.

Reactor	pH	T (°C)	OD (mg L ⁻¹)	Turbidez (NTU)	Vol. lodo (V30)
Crudo	8.34	17.9	--	109.83	--
Anóxico 1	7.50	16.9	--	--	--
Anóxico 2	7.06	1,7	--	--	--
Anóxico 3	6.81	16.7	--	--	--
Aerobio 1	6.90	16.4	2.17	--	120
Aerobio 2	6.85	16.6	2.31	--	100
Anóxico 4	6.82	16.6	--	--	--
Sed.					
Secundario	6.87	16.6	--	--	--
Efluente	--	--	--	6.05	--

3.2 Caracterización de inóculos microbianos aeróbicos

3.2.1 Caracterización físico-química

La determinación de sólidos es una de las técnicas más importantes usada dentro de las PTARs ya que el control de sólidos tiene efecto directo en el funcionamiento, capacidad,

sistema de operación e incluso costos de la planta. Los SST y SSV son una medida aproximada de la biomasa presente en el agua residual y en los lodos activados (FCMNRC, 2004).

La Tabla 4 presenta los valores de SSV, SST y la relación entre los mismos para los tres lodos evaluados en este estudio. Los valores de SSV en los tres casos son similares, siendo el lodo del licor mezcla (LM) el más bajo. Este resultado tiene sentido ya que en el licor mezcla (LM) se encuentran principalmente los microorganismos responsables del tratamiento biológico de AR, por su parte en los lodos de recirculación (RAS) y lodos anóxicos (LA) además de microorganismos también se encuentra material particulado y materia orgánica sedimentada (Metcalf et al., 2014). En los lodos recirculación, lodos licor mezcla y lodos anóxicos la relación entre SSV y SST fue 67.0, 71.8 y 66.9%, respectivamente, valores típicos obtenidos para plantas de tratamiento de AR, en donde la relación de SSV/SST están entre 60 y 70% (Metcalf et al., 2014). Estos resultados son similares a los obtenidos en el estudio realizado por Valarezo, cuyo objetivo principal fue determinar la toxicidad de aceites quemados en lodos activados de una PTAR. En dicho estudio se reportó un una relación de SST/SSV 78.7% para lodos provenientes de plantas de tratamiento de aguas residuales domésticas e industriales de la ciudad de Quito (Valarezo, 2010).

Tabla 4. Sólidos suspendidos totales, sólidos suspendidos volátiles y su relación determinada de las muestras de lodo tomadas en los diferentes puntos en la PTAR piloto de Quito ubicada en las instalaciones de la EPMAPS, en la descarga del colector central Iñaquito "Batán"

Lodos	SST (g L ⁻¹)	SSV (g L ⁻¹)	SSV/SST (%)
Recirculación (RAS)	1.65	1.11	67.0
Licor mezcla (LM)	1.38	0.99	71.8
Anóxico (LA)	1.63	1.09	66.9

3.2.2 Caracterización biológica

En la Figura 2 se presenta las curvas de crecimiento microbiano en función del tiempo del consorcio microbiano presente en los lodos muestreados en la PTAR piloto de Quito. En los bioensayos con los diferentes lodos aeróbicos se puede observar que el incremento de la biomasa es notorio, ya que la absorbancia aumenta en función del tiempo y esto es directamente proporcional al incremento en la concentración de microorganismos en el medio. Mientras que en el control abiótico, el cual carece de inóculo microbiano, no se evidencia cambios en la absorbancia a través del tiempo. Estas son curvas típicas de crecimiento microbiano con la fase de latencia, la cual es la fase de adaptación de los microorganismos al medio, seguida de la fase exponencial o crecimiento logarítmico en donde la actividad metabólica incrementa notablemente y las células se multiplican y la fase estacionaria, aquella en donde no hay crecimiento poblacional y el número de células se estabiliza porque nuevas células reemplazan a células viejas (Negroni, 2009). En los lodos anóxicos (LA) la fase de latencia es mucho más pronunciada, seguida por los lodos de recirculación (RAS) y finalmente los lodos de licor mezcla (LM) en donde la fase de crecimiento empieza a darse casi de manera inmediata. Valarezo reporta una curva similar de crecimiento microbiano en una PTAR para lodos provenientes de plantas de tratamiento de aguas residuales domésticas e industriales de la ciudad de Quito bajo condiciones similares de cultivo a las empleadas en este estudio (Valarezo, 2010).

El objetivo del cultivo enriquecido es obtener un grupo debidamente seleccionado de microorganismos, los cuales son sometidos a un periodo de adaptación bajo condiciones óptimas desde el punto de vista nutricional y ambiental, para de esta manera promover su crecimiento (Metcalf et al., 2014). Las bacterias que se encuentran

en un cultivo enriquecido, con un determinado sustrato, en este caso glucosa, utilizan al mismo como principal fuente de carbono y energía (Bajaj et al., 2008). Por ello, la utilización de glucosa también como fuente de carbono en los bioensayos posteriores, provoca que las bacterias se encuentran mucho más adaptadas a degradar la misma y los períodos de degradación serán más cortos.

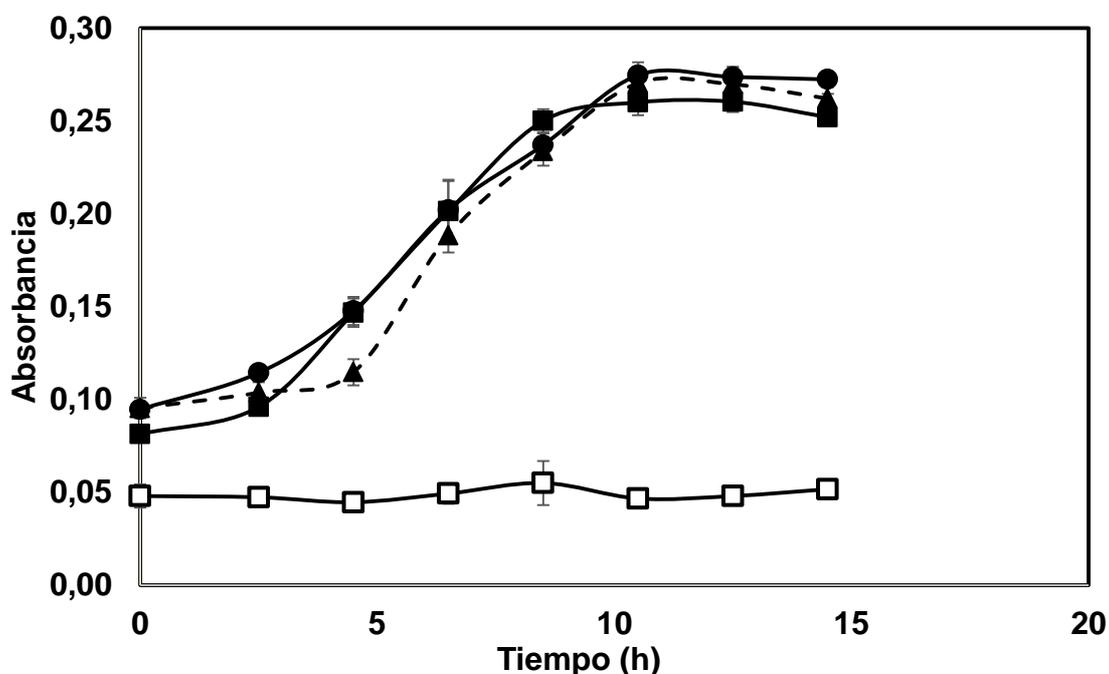


Figura 2. Curvas de crecimiento microbiano en función del tiempo del consorcio microbiano presente en los lodos muestreados en la PTAR piloto de Quito en bioensayos realizados con 5% (v/v) de inóculo microbiano y 3000 mg L⁻¹ glucosa como sustrato o fuente de carbono. Leyenda: (□) Control abiótico (CA), (■) Lodos de recirculación (RAS), (●) Lodos licor mezcla (LM) y (▲) Lodos anóxicos (LA). Las barras de error (más largas que los símbolos) representan la desviación estándar de los ensayos por triplicado.

Los bioensayos de caracterización biológica de los lodos aeróbicos fueron desarrollados de acuerdo a la metodología descrita en la sección de Materiales y Métodos. En la Figura 3 se presenta la degradación de glucosa en función del tiempo por consorcios microbianos presentes en los diferentes lodos muestreados en la PTAR piloto de Quito. En esta figura se puede observar un claro decaimiento en la concentración de glucosa por acción metabólica de los microorganismos presentes en el consorcio microbiano de cada uno de los lodos estudiados, lo cual guarda directa relación con el crecimiento microbiano presentado en la Figura 2. Dicho comportamiento es mucho más notorio en los lodos del licor mezcla (LM) y en los lodos anóxicos (LA) en donde durante los primeros intervalos de tiempo la concentración de sustrato en el medio es máxima, lo cual es correspondiente con los intervalos de tiempo de la fase de latencia de crecimiento de los mismos lodos, esto mostrado en la Figura 2. Posteriormente, la concentración del sustrato decae en los diferentes lodos, Figura 3, lo que era de esperarse ya que este corresponde a la fase exponencial de crecimiento microbiano, Figura 2. El control abiótico (CA), por su parte, se mantiene con la concentración inicial de sustrato lo que claramente indica que en los bioensayos de tratamiento son efectivamente los microorganismos los responsables de la degradación de la glucosa. Este comportamiento es bastante lógico ya que al tratarse, en este caso, de ensayos tipo batch, en los cuales el crecimiento microbiano está caracterizado por las fases expuestas anteriormente, se esperaría que en el tiempo cero el sustrato y los nutrientes se encuentren presentes en exceso, ya que durante este periodo de tiempo sólo existe una pequeña cantidad de biomasa que se adapta gradualmente, por lo que su actividad metabólica es mínima. A medida que los microorganismos crecen, el sustrato decrece hasta agotarse completamente, y es en la fase de crecimiento o fase exponencial en donde ocurre el mayor consumo de sustrato (Metcalf et al., 2014).

En la Tabla 5 se presenta las actividades máximas específicas de consumo de glucosa para cada uno de los lodos evaluados. Las pendientes de las curvas de degradación de sustrato con respecto al tiempo fueron calculadas y normalizadas con respecto al tratamiento en donde se produjo una mayor degradación de sustrato empleando la Ecuación 1 presentada en la sección de Materiales y Métodos. En este caso, se empleó el bioensayo con el lodo licor mezcla (LM) para la normalización de la actividad microbiana, ya que este presenta una mayor actividad máxima específica que los demás inóculos microbianos. La actividad máxima específica de consumo de glucosa obtenida en este estudio en todos los lodos (Tabla 5) es mucho menor a aquella reportada por Valarezo en su investigación, $12214.77 \text{ mg glucosa g SSV}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (Valarezo, 2010). Esta variación de un orden de magnitud puede atribuirse a que los inóculos microbianos evaluados en dicho estudio se encontraban más saludables y activos en comparación con los reportados en esta investigación.

Finalmente en base a estos resultados, se determina que el mejor inóculo microbiano es el del licor mezcla ya que presenta la mayor relación SSV/SST y la mayor actividad máxima específica de consumo de glucosa lo que sugiere que los microorganismos presentes en este inóculo se encuentran mejor adaptados para degradar la glucosa y estos se emplearán para desarrollar los bioensayos de toxicidad microbiana.

Tabla 5. Actividad máxima específica de consumo de glucosa y porcentaje de actividad determinado de los tres lodos muestreados (RAS), (LM), (LA) de la planta piloto de tratamiento de aguas residuales de Quito, ubicada en las instalaciones de la EPMAPS, en la descarga del colector central Iñaquito “Batán” en presencia de un inóculo microbiano de 5% (v/v) y glucosa como sustrato o fuente de carbono (1000 mg L^{-1}).

Inóculos microbianos	Act. Máxima específica consumo glucosa (mg glucosa g SSV ⁻¹ .d ⁻¹)	Actividad (%)
Lodos de recirculación (RAS)	1468.11	45.0
Lodos licor mezcla (LM)	3263.52	100.0
Lodos anóxicos (LA)	2110.68	64.7

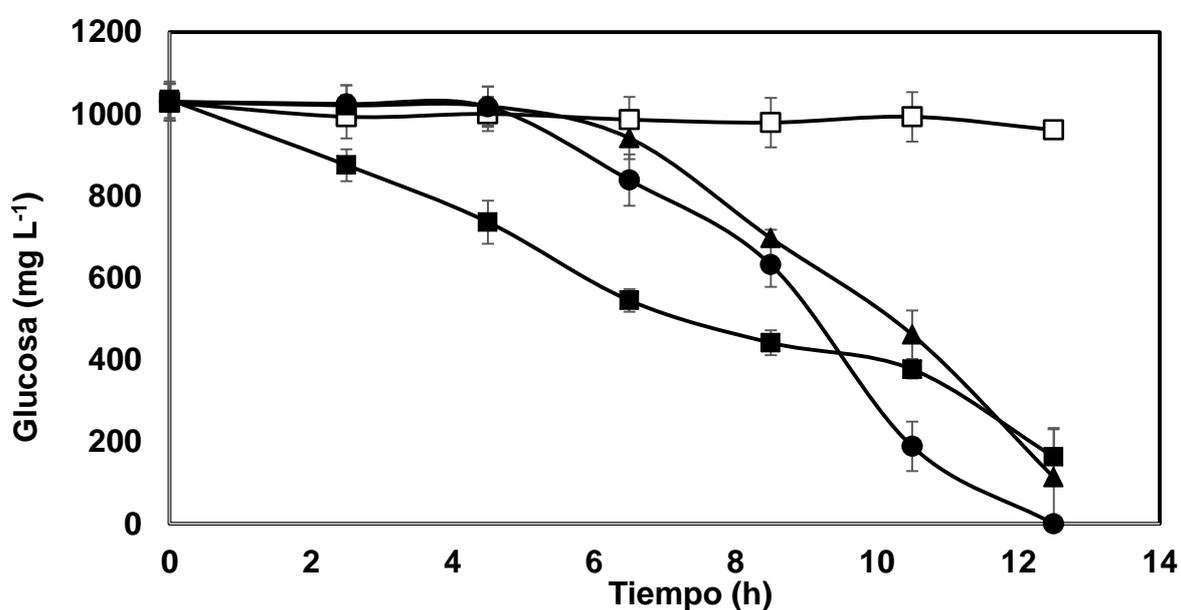


Figura 3. Degradación de glucosa en función del tiempo por acción de consorcios microbianos presentes en los diferentes lodos muestreados en la PTAR piloto de Quito en bioensayos realizados con 5% (v/v) de inóculo microbiano y 3000 mg L⁻¹ de glucosa como sustrato o fuente de carbono (3000 mg L⁻¹). Leyenda: (□) Control abiótico (CA), (■) Lodos de recirculación (RAS), (●) Lodos licor mezcla (LM) y (▲) Lodos anóxicos (LA). Las barras de error (más largas que los símbolos) representan la desviación estándar de los ensayos por triplicado.

3.2.4 Toxicidad Microbiana

En la Figura 4 se presenta la degradación de glucosa en función del tiempo por acción de un cultivo enriquecido de microorganismos presentes en el la muestra de lodos del licor mezcla (LM) en presencia de cafeína en diversas concentraciones. Los bioensayos fueron realizados según lo descrito en la sección de Materiales y Métodos en donde se incluyeron dos controles: control abiótico (CA) (ausencia de inóculo microbiano) y un control biótico (CB) (ausencia de agente inhibidor cafeína). El control abiótico (CA) tiene por objetivo demostrar que la degradación de la glucosa es catalizada por los microorganismos; mientras que, el control biótico (CB) permite determinar la actividad máxima específica degradación de glucosa en ausencia de la cafeína y por lo tanto determinar si este agente produce inhibición. En la Figura 4 se puede observar que a una concentración de cafeína de 10 mg L^{-1} no existe efecto inhibitorio en la degradación de la glucosa, mientras que un incremento en la concentración de cafeína a 25 mg L^{-1} presenta un efecto inhibitorio poco significativo y es a partir de 50 mg L^{-1} cuando se evidencia un efecto tóxico en los microorganismos degradadores de glucosa. En la Tabla 6 se presenta las actividades máximas específicas de consumo de glucosa para cada una de los bioensayos, el porcentaje de actividad y el porcentaje de inhibición. Los resultados del porcentaje de actividad se presentan en la Figura 5. En la Tabla 7 se presentan las concentraciones de cafeína que producen 20, 50 y 80% de inhibición en la actividad máxima específica de degradación de la glucosa y son 50, 75 y mayor a 100 mg L^{-1} , respectivamente.

Hasta alrededor de los años 70 se creía que la cafeína era tóxica para los microorganismos pero ningún tipo estudio fue reportado en la literatura (Gopishetty et al., 2011). Con el paso del tiempo varios estudios sobre el efecto de la cafeína en el crecimiento microbiano han sido efectuados. Yu CL y colaboradores en un estudio sobre dos rutas distintas en el metabolismo de la teofilina y cafeína en *Pseudomonas putidas* CBB5

determinaron que después de 72 horas de cultivo una concentración de cafeína de 2.5 g L^{-1} registró una degradación de hasta 0.2 g L^{-1} por acción de las CBB5 en comparación con un mismo porcentaje de degradación después de 20 horas en presencia de un consorcio microbiano (Yu CL et al., 2009). Estos resultados sugieren que los efectos de la cafeína varían dependiendo del tipo de microorganismos (Gaula et al., 2015) y a las concentraciones de cafeína a las que los mismos se encuentran expuestos. Según Voloshenko-Rossin y colaboradores la cafeína en altas concentraciones afecta a los microorganismos porque inhibe la síntesis de proteínas posterior a la traducción del ARN, ya que la cafeína no afecta a la misma, adquiriendo a altas concentraciones acción bactericida (Voloshenko-Rossin et al., 2015).

Gheorghe y colaboradores, en un estudio realizado en Rumania para determinar el efecto inhibitorio de contaminantes emergentes, principalmente compuestos farmacéuticos, reportaron un valor de IC_{50} de $88.6 \pm 1.7 \text{ mg L}^{-1}$ en *Vibrio fischeri* bacteria, *Microbacterium sp.* y otras 9 especies de microorganismos bajo condiciones típicas de ambientes acuáticos en donde este tipo de compuestos farmacéuticos son descargados (Gheorghe et al, 2016). Dicho valor se encuentra en el mismo orden de magnitud que el obtenido en este estudio. Así mismo, otra investigación realizada por Basnyat en la Universidad de Tampere, para evaluar el efecto de compuestos farmacéuticos en la eficiencia de tratamiento biológico en las PTARs reportó valores de 20 mg L^{-1} para una inhibición del 54.9% en un consorcio microbiano de lodos provenientes de la PTAR de Tampere a condiciones estándar (Basnyat, 2010), este valor aproximadamente cuatro veces menor al obtenido en el presente estudio. Estas diferencias pueden ser atribuibles a las condiciones experimentales bajo las que se realizó el presente estudio entre las cuales se puede mencionar la concentración del sustrato utilizado en los bioensayos, ya que en otras

investigaciones se sugiere que la inhibición microbiana en este tipo de análisis se encuentra directamente relacionada con la cantidad de materia orgánica añadida, más que a la concentración de agente inhibidor en sí (Shuyi et al., 2008). Shuyi y colaboradores en su investigación sobre el efecto de compuestos farmacéuticos activos en comunidades de consorcios microbianos provenientes de plantas de tratamiento de aguas residuales, mediante ensayos batch con diferentes cargas orgánicas corrobora dicha afirmación. En este estudio a bajas concentraciones de carga orgánica, rangos entre 34 y 43% de inhibición, fueron observados en el consorcio microbiano mientras que a mayores concentraciones de carga orgánica, ningún efecto inhibitorio fue observado en presencia de varios compuestos farmacéuticos activos (Shuyi et al., 2008).

Otro factor de igual importancia es que la cafeína presenta afinidad por los componentes inorgánicos del lodo, en otras palabras en un medio poroso la capacidad de eliminar cafeína por adsorción y biodegradación es mucho mayor (Martínez et al., 2016), ya que una vez transcurrida la etapa de adsorción por afinidad de la cafeína al medio poroso, existe una tendencia de mayor adaptación microbiana a este compuesto (Martínez et al., 2016). Es decir la toxicidad presentada va a depender de la combinación de estos dos procesos, del tiempo de adsorción de la cafeína a los lodos, como del tiempo de adaptación para la degradación de la misma por acción de los microorganismos, por lo que la cinética de remoción de la cafeína depende de la adaptación para la degradación de la misma.

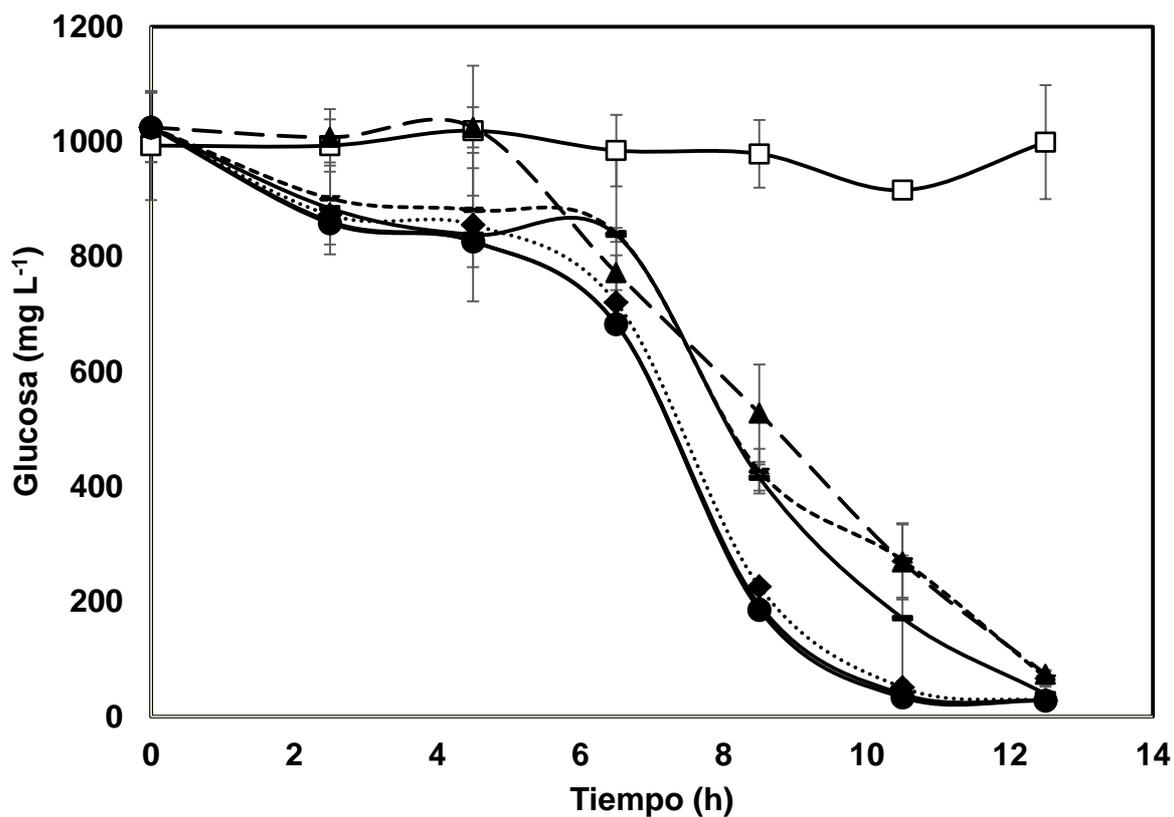


Figura 4. Degradación de glucosa en función del tiempo por acción de un consorcio microbiano 5% (v/v) de la muestra del licor mezcla (LM) de la PTAR piloto de Quito en presencia de 1000 mg glucosa L⁻¹ y un incremento en concentraciones de cafeína en (mg L⁻¹): (●) 0, (□) 100, (◇) 10, (◆) 25, (— —) 50, (— — —) 75 y, (▲) 100. Las barras de error (más largas que los símbolos) representan la desviación estándar de los ensayos por triplicado.

Tabla 6. Actividad máxima específica de consumo de glucosa, porcentaje de actividad y porcentaje de inhibición en el consorcio microbiano proveniente del licor mezcla (LM) de la PTAR piloto de Quito por la presencia de cafeína ubicada en las instalaciones de la EPMAPS, en la descarga del colector central Iñaquito “Batán” en presencia de un inóculo microbiano de 5% (v/v) y glucosa (1000 mg L^{-1}).

Cafeína (mg L^{-1})	Actividad máxima específica de consumo ($\text{mg glucosa g SSV}^{-1} \text{ d}^{-1}$)	Actividad (%)	Inhibición (%)
0 (CB)	6025.70	100.00	0.00
10 (T1)	5921.21	98.27	1.73
25 (T2)	5991.03	99.42	0.58
50 (T3)	4040.48	67.05	32.95
75 (T4)	2999.03	49.77	50.23
100 (T5)	2915.39	48.38	51.62

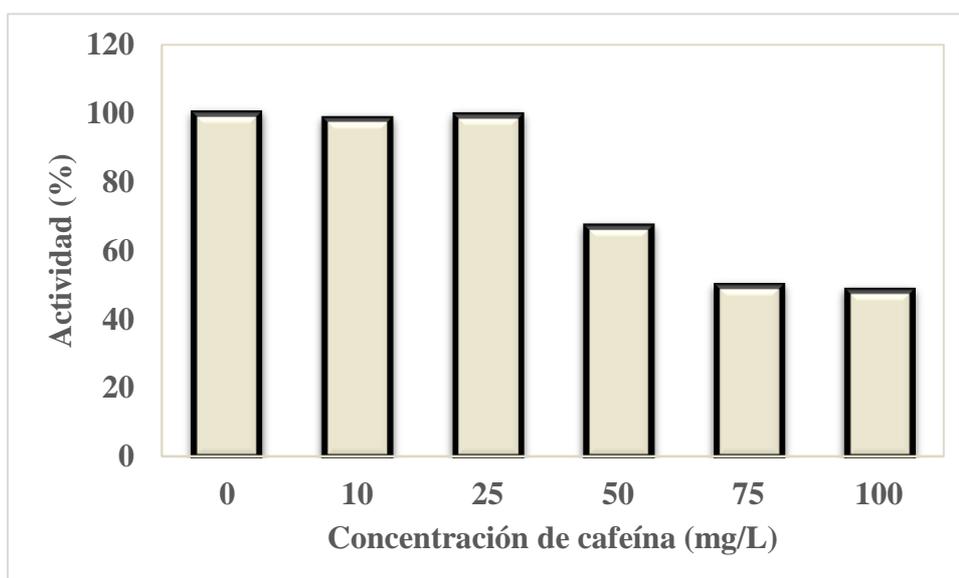


Figura 5. Efecto inhibitorio del incremento en la concentraciones de cafeína en la actividad máxima específica de consumo de glucosa en un consorcio microbiano 5% (v/v) obtenido del licor mezcla (LM) de la PTAR piloto de Quito en (mg L^{-1}). Las barras de error (más largas que los símbolos) representan la desviación estándar de los ensayos por triplicado

Tabla 7. Efecto inhibitorio de la cafeína en los microorganismos presentes en el consorcio microbiano de 5% (v/v) proveniente del licor mezcla (LM) de la PTAR piloto de Quito. IC₂₀, IC₅₀, IC₈₀ son las concentraciones de cafeína causantes del 20, 50 y 80% de inhibición en la actividad de los microorganismos estudiados

Substrato	Condición redox	Toxicidad	IC ₂₀	IC ₅₀ (mg L ⁻¹)	IC ₈₀
Glucosa	Aeróbica	Actividad	50	75	>100 ^a

^a La mayor concentración evaluada de glucosa fue 100 mg L⁻¹.

En vista de que la concentración de la cafeína en el río Machángara Norte son de $5,597 \pm 5,077 \text{ ng.L}^{-1}$ (Voloshenko-Rossin et al., 2015), también se evaluó el efecto inhibitorio de la cafeína a concentraciones inferiores a 10 mg L^{-1} . En la Figura 6 se muestra los resultados obtenidos para concentraciones de cafeína por debajo de aquellas determinadas en el estudio de Voloshenko-Rossin y colaboradores (Voloshenko-Rossin et al., 2015). En este caso, no se observan variaciones representativas como si ocurría a mayores concentraciones. Las pequeñas variaciones mostradas en las gráficas o en los valores de inhibición pueden deberse a errores experimentales y en ningún caso superan el 3% de inhibición (Tabla 8)

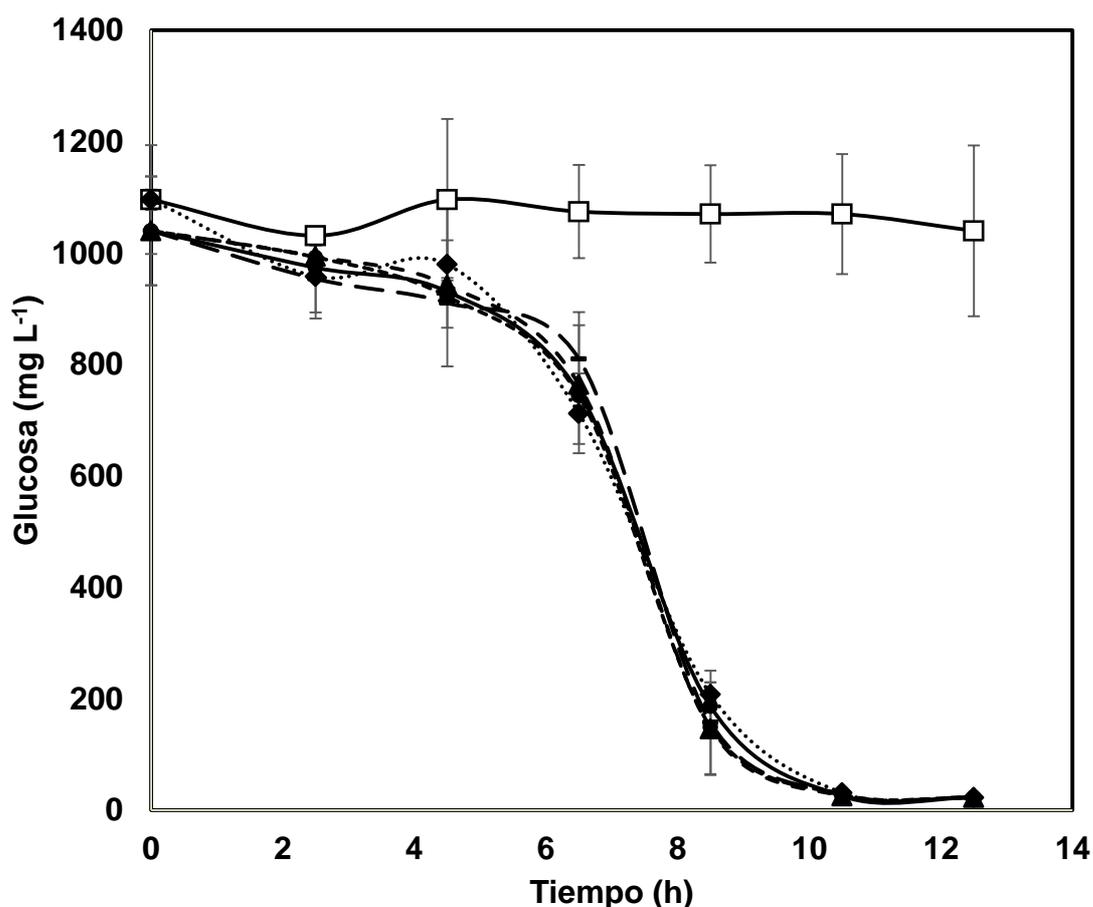


Figura 6. Degradación de glucosa en función del tiempo por acción de un consorcio microbiano 5% (v/v), obtenido de la muestra del licor mezcla (LM) de la PTAR piloto de Quito en presencia de 1000 mg glucosa L⁻¹ y bajas concentraciones de cafeína en (mg L⁻¹): (●) 0, (□) 10, (◐) 1, (—) 2.5, (▲) 5 y (◆) 10. Las barras de error (más largas que los símbolos) representan la desviación estándar de los ensayos por triplicado.

Tabla 8. Actividad máxima específica de consumo de glucosa, porcentaje de actividad y porcentaje de inhibición en el consorcio microbiano de 5% (v/v) proveniente del licor mezcla (LM) de la PTAR piloto de Quito por la presencia de cafeína a bajas concentraciones

Concentración (mg L ⁻¹)	Act. Máxima específica de consumo (mg glucosa g SSV ⁻¹ .d ⁻¹)	Actividad %	Inhibición %
0 (CB)	4082.18	100.00	0.00
1 (T1)	3970.67	97.27	2.73
2,5 (T2)	3998.55	97.95	2.05
5 (T3)	3974.30	97.36	2.64
10 (T4)	4059.64	99.45	0.55

5. CONCLUSIONES

En la caracterización físico-química se determinó que los lodos provenientes del licor mezcla (LM) de la PTAR piloto de Quito demostraron ser el mejor inóculo microbiano evaluado con una relación mayor de SSV/SST a la de los otros lodos muestreados y dentro de los valores esperados para PTAR. Por su parte en la caracterización biológica se determinó en función de la actividad máxima específica de consumo de glucosa que los inóculos microbianos evaluados en este estudio se encontraban menos saludables y activos que aquellos reportados en la literatura.

Así mismo los resultados de este estudio confirman que la cafeína resulta inhibitoria en los microorganismos presentes en los consorcios microbianos de lodos provenientes de plantas de tratamiento de aguas residuales en concentraciones superiores a aquella máxima concentración encontrada en el río Machángara norte del Ecuador. Por lo tanto, la cafeína en las concentraciones reportadas en las descargas de aguas residuales municipales no presenta un efecto inhibitorio lo cual podría ser atribuido a la rápida adaptación microbiana del inóculo en presencia de bajas concentraciones del compuesto.

5. Referencias bibliográficas

- ADI. (2016). Wastewater treatment and waste to energy solutions: Conventional activated sludge process. Retrieve from <https://www.adisystemsinc.com/en/technologies/aerobic-treatment/conventional-activated-sludge-process>
- Ahmad, S. (2014). Bacterial Degradation of Caffeine: A Review. Retrieved on March 15th 2017 from <http://journal.hibiscuspublisher.com/index.php/AJPB/article/view/84>
- Al-Janabi, A.A.H.S. (2011). Potential activity of the purine compounds caffeine and aminophylline on bacteria. *J Glob Infect Dis* 3, 133–137
- Almeida Almeida M.C., Butler D. and Friedler E. (2000) A source domestic wastewater quality. *Urban Water* 1, 49–55.
- Andrews, J. (2002). Determination of minimum inhibitory concentrations. PMID:11420333
- APHA, Standard Methods for the examination of water and wastewater 1998 ed, ed. L.S. Clesceri, A.E. Greenberg, and A.D. Eaton. 1998, Washington D.C American Public Health Association (APHA).
- Bajaj, C.G., J. Winter Effect of Co-Substrates on Aerobic Phenol Degradation by Acclimatized and Non-acclimatized Enrichment Cultures *Engineering Life Science* 2008: p. 125-131.
- Basnyat, P (2010). Evaluation of toxicity of pharmaceuticals to the activated sludge treatment plant. Tampere university of technology. Tampere, Finlandia,: Tampere university of technology. Retrieved on March 15th 2017 from <https://dspace.cc.tut.fi/dpub/bitstream/handle/123456789/20530/basnyat.pdf?sequence=3&isAllowed=y>
- Bodog, M, & Derecichei, L. (2010). Wastewater treatment. Retrieved on March 15th 2017 from http://protmed.uoradea.ro/facultate/anale/protectia_mediului/2010/im/03.%20Bodog%20Marinela%202.pdf
- Dash, S.S., and N. Gummadi, S. (2008). Inhibitory Effect of Caffeine on Growth of Various Bacterial Strains. *Research Journal of Microbiology* 3, 457–465.
- EPA. (2016). Method for Determining the Turbidity of a Water Sample. US Environmental Protection Agency. Washington DC: EPA, 1979. 180.1.
- EPMAPS. (2016). EPMAPS con parámetros de tratamiento de aguas residuales en planta a pequeña escala. Obtenido el 15 de Marzo 2017 de http://prensa.quito.gob.ec/index.php?module=Noticias&func=news_user_view&id=19778&umt=EPMAPS%20con%20par%20E1metros%20de%20tratamiento%20de%20aguas%20residuales%20en%20planta%20a%20peque%F1a%20escala
- ESPIGARES GARCÍA, M. y PÉREZ LÓPEZ, JA. (1985). Aspectos sanitarios del estudio de las aguas. Universidad de Granada. Servicio de Publicaciones. Granada. 1985.

- FCMNRC. (2004). Solids Inventory Control for Wastewater Treatment Plant Optimization. ISBN 1-897094-60-4
- FESTO. (2015). Wastewater treatment. Retrieved on March 15th 2017 from http://www.festo-didactic.com/ov3/media/customers/1100/teaser_8027890_wastewater_treatment_del.pdf
- Fruechlin, H, & Scheinder, C. & Egli, T. (2011). In glucose-limited continuous culture the minimum substrate concentration for growth, s_{min} , is crucial in the competition between the enterobacterium *Escherichia coli* and *Chelatobacter heintzii*, an environmentally abundant bacterium. doi: 10.1038/ismej.2011.143
- Gaula, J & Donegan, K. (2015). Caffeine and Its Effect on Bacteria Growth. Department of Biology, Rutgers University, Camden, NJ 08102
- Gheorghe, S., Petre, J., Lucaciu, I., Stoica, C., Nita-Lazar, M. (2016). Risk screening of pharmaceutical compounds in Romanian aquatic environment. *Environ Monit Assess* (2016) 188:379. Doi: 10.1007/s10661-016-5375-3
- Gopishetty SR, Louie TM, Yu CL, Subramanian MV, Microbial degradation of caffeine, methylxanthines, and its biotechnological applications. In Thatoi HN, Mishra BB (ed), *Microbial biotechnology methods and applications*. 2011; 44–67.
- Jurtshuk, P. (1996). Medical microbiology: Bacterial metabolism: Respiration. PMID: 21413278
- Lakishmi, V. (2014). Removal of caffeine from industrial wastewater using *Trichosporon asahii*. Retrieved on March 15th 2017 from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24640246>
- La prensa (2017). Planta de tratamiento de aguas residuales Quitumbe. Obtenido el 15 de Marzo 2017 de http://prensa.quito.gob.ec/index.php?module=Noticias&func=news_user_view&id=23910&umt=Quito%20ya%20cuenta%20con%20la%20Planta%20de%20Tratamiento%20de%20Aguas%20Residuales%20m%20E1s%20moderna%20del%20pa%20EDs
- Makinia, J. & Scott, A. & Zima, P. (2005). Temperature Modeling in Activated Sludge Systems: A Case Study *Water Environment Research*, Volume 77, Number 5
- Martín J, Camacho-Muñoz D, Santos JL, Aparicio I, Alonso E. Occurrence of pharmaceutical compounds in wastewater and sludge from wastewater treatment plants: Removal and ecotoxicological impact of wastewater discharges and sludge disposal. *J Hazard Mater*. 2012;239–240:40–47. doi: 10.1016/j.jhazmat.2012.04.068
- Martínez, V., Meffe, R., Herrera, S., Bustamante, I. (2016). The role of sorption and biodegradation in the removal of acetaminophen, carbamazepine, caffeine, naproxen and sulfamethoxazole during soil contact: A kinetics study. *Science of the Total Environment* 559 (2016) 232–241. Doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.03.131
- Metcalf & Eddy, I., *Wastewater Engineering Treatment and Reuse* 5th ed. 2014, New York: McGraw-Hill

- Mittal, A. (2011). Biological Wastewater treatment: Aerobic Biological Treatment Technologies. Retrieved on March 15th 2017 from <https://www.watertoday.org/Article%20Archive/Aquatech%2012.pdf>
- Negrón, M. (2009). Microbiología estomatológica: Fases del crecimiento microbiano. Segunda edición. Editorial Médica Panamericana
- NGWA (2012). Information on Earth's water: Distribution of the Earth's water. Retrieve from [http://www.ngwa.org/Fundamentals/teachers/Pages/information-treatment systems. Science of the Total Environment 412-413 \(2011\) 380. on-earth-water.aspx](http://www.ngwa.org/Fundamentals/teachers/Pages/information-treatment%20systems.Science%20of%20the%20Total%20Environment%20412-413%20(2011)%20380.on-earth-water.aspx)
- Ochoa, V, & Banihani, Q, & León, G, & Khatri, C, & Field, J, & Sierra, R. (2011). Toxicity of fluoride to microorganisms in biological wastewater
- OMS. (2016). Agua: Acceso al agua. Obtenido el 15 de Marzo 2017 de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs391/es/>
- Peeler KA, Opsahl SP, Chanton JP.(2006). Tracking anthropogenic inputs using caffeine, indicator bacteria, and nutrients in rural freshwater and urban marine systems. *Environ Sci Technol*; 40(24):7616–7622. doi: 10.1021/es061213c.
- Rheingans, C.L.M.a.R.D., Global Challenges in water, sanitation and health. *Journal of Water and Health*, 2006. 04 Supplement 1: p. 41-57.
- Shuyi, W., Holzem, R., Gunsch, C. (2008) Effects of Pharmaceutically Active Compounds on a Mixed Microbial Community Originating from a Municipal Wastewater Treatment Plant. *Environmental Science technology* Vol. 42, 1091-1095. Doi: 10.1021/es072026x
- Thangaraj, Naina., Siddharth, Sharan., Suneetha, Vuppu. (2013) Role of *Proteus mirabilis* in Caffeine Degradation- A Preliminary Bioinformatics Study. *Research Journal of Recent Sciences* Vol.2 (ISC-2012), 33-40 (2013)
- Valarezo, N. (2010). Efecto de la concentración de la biomasa y la presencia de aceites vegetales, aceites vegetales quemados, sales e hidrocarburos en los lodos activados (Tesis de pregrado). Universidad San Francisco de Quito, Cumbaya.
- Voloshenko, A., Gasser, G., Cohen, K., Cumbal, L., Parra, W., Sarabia, F., Ojeda, F., & Lev, O. (2015). Emerging pollutants in the Esmeraldas watershed in Ecuador: discharge and attenuation of emerging organic pollutants along the San Pedro– Guayllabamba– Esmeraldas rivers. 2015 Jan;17(1):41-53. doi: 10.1039/c4em00394b.
- Wilén, B.-M. and Balmér, P. (1999) The effect of dissolved oxygen concentration on the structure, size and size distribution of activated sludge flocs, *Water Res.* 33, 391-400
- Yu CL, Louie TM, Summers R, Kale Y, Gopishetty S, Subramanian M. Two distinct pathways for metabolism of theophylline and caffeine are coexpressed in *Pseudomonas putida* CBB5. *J. Bacteriol.* 2009; 191(14):4624–4632. *Mutat. Res.*1974; 26:53–71. *Royal society of chemistry.* 2050-788

