



**UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM**

Ciencias de la Vida

Ingeniería en Biotecnología

***Ultrafiltración de agua superficial de un sistema fluvial urbano: Análisis de comunidades bacterianas y virales asociadas.***

**Shirley Betzabé Tello Constante**

10 de septiembre de 2020, ciudad de Tena, Napo,  
Ecuador

## **Declaración de derecho de autor, autenticidad y responsabilidad**

Tena, 10 de septiembre de 2020

Yo, Shirley Betzabé Tello Constante con documento de identidad N° 0504427055, declaro que los resultados obtenidos en la investigación que presento en este documento final, previo a la obtención del título Ingeniería en Biotecnología son absolutamente inéditos, originales, auténticos y personales.

En virtud de lo cual, el contenido, criterios, opiniones, resultados, análisis, interpretaciones, conclusiones, recomendaciones y todos los demás aspectos vertidos en la presente investigación son de mi autoría y de mi absoluta responsabilidad.

Por la favorable atención a la presente, suscribo de usted,

Atentamente,

Firma:



---

Shirley Betzabé Tello Constante

## **Certificado de dirección de trabajo de integración curricular**

Certifico que el trabajo de integración curricular titulado: “Ultrafiltración de agua superficial de un sistema fluvial urbano: Análisis de poblaciones bacterianas y virales asociadas”, en la modalidad de: proyecto de investigación en formato tesis, fue realizado por: Shirley Betzabé Tello Constante, bajo mi dirección.

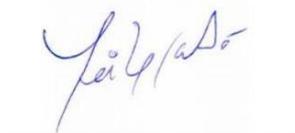
El mismo ha sido revisado en su totalidad y analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto, cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad Regional Amazónica Ikiam, para su entrega y defensa.

Tena, 10 de septiembre de 2020



Miguel Herrera Robledo

C.I: G07498271



Yeimy Rojas

CC: 1757847783

## **APROBACIÓN DEL TRIBUNAL**

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, quiero agradecer a Dios, por guiarme y llenarme de fuerza en este largo camino que acaba de empezar.

Gracias a mis padres, Alex y Ruth, por ser los principales motores de mis sueños por su confianza y apoyo incondicional durante todo este proceso, a mis hermanos Danny y Camila, por su cariño y risas compartidas a pesar de la distancia.

Mi profundo agradecimiento a la Universidad Ikiam y a cada uno de los técnicos de laboratorio por las enseñanzas y experiencias vividas, por confiar en mí, abrirme las puertas y realizar todo el proceso investigativo.

De igual manera mis agradecimientos al proyecto *“Hi water: Efficient and affordable water treatment technologies to minimise waterborne diseases”* por el financiamiento de esta investigación; así como también a los técnicos docentes del Laboratorio de Geociencias, Laboratorio Nacional de Referencia del Agua y al Laboratorio de Biología Molecular y Bioquímica por su participación en el diseño de la investigación y trabajo de laboratorio.

Mi profundo agradecimiento a mi Director de Tesis PhD. Miguel Herrera Robledo y a la M.Sc. Yeimy Rojas de Hidalgo por su gran colaboración en el desarrollo del presente proyecto de titulación. A todos los profesores con quienes compartí una aula y conversación que de alguna forma supieron llegar a mí con sus conocimientos dejando en mi la semilla del amor por la investigación. A mis amigos, en especial a mi compañera de departamento con quienes compartí experiencias inolvidables al estar fuera y lejos de casa.

Un especial agradecimiento a mi colega, compañera y amiga que aportó a este proyecto con sus conocimientos haciendo este proceso más fácil.

**Shirley Betzabé Tello Constante**

## ÍNDICE GENERAL

### CARÁTULA

DERECHO DE AUTOR .....	ii
CERTIFICADO DEL DIRECTOR .....	iii
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL.....	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
ÍNDICE GENERAL.....	vi
ÍNDICE DE TABLAS .....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	ix
RESUMEN .....	xii
ABSTRACT .....	xiii
CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN .....	1
1.1 Antecedentes .....	1
1.2 Planteamiento del problema .....	6
1.3 Justificación de la investigación .....	6
1.4 Objetivos de la investigación.....	7
CAPÍTULO II: MARCO METODOLÓGICO .....	8
2.1 Selección del sitio muestreo .....	8
2.2 Recolección de muestras .....	8
2.3 Determinación de los parámetros fisicoquímicos de calidad del agua superficial del Río Tena .....	10
2.4 Análisis microbiológico de la calidad del agua superficial del Río Tena en la zona de alta carga. ....	10
2.5 Experimentos de Ultrafiltración .....	11
2.6 Aproximación matemática del fenómeno de ultrafiltración de agua superficial a presión transmembrana (PTM) constante .....	12
2.7 Mecanismo de bloqueo de poro durante la formación de <i>fouling</i> en la membrana.....	16

2.8 Extracción, PCR y electroforesis de ADN metagenómico de agua superficial del río Tena. ....	17
2.9 Análisis estadístico .....	20
CAPÍTULO III: PRESENTACIÓN DE DATOS Y RESULTADOS .....	21
3.1 Caracterización fisicoquímica del agua superficial de la zona urbana del río Tena.....	21
3.2 Caracterización microbiológica de agua superficial del río Tena .....	22
3.3 Remoción de parámetros fisicoquímicos y microbiológicos del agua superficial del río Tena por el sistema de ultrafiltración .....	24
3.4 Rendimiento del sistema de ultrafiltración en la potabilización de agua superficial .....	28
3.5 Estimación de contaminantes fisicoquímicos, microbianos y virales asociados al <i>biofouling</i> en la membrana .....	37
3.6 Detección de ADN bacteriano presente en la composición del <i>biofouling</i> depositado en la membrana .....	40
CAPÍTULO IV: INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN .....	42
4.1 Caracterización de parámetros fisicoquímicos y microbiológicos de agua superficial .....	42
4.2 Eficiencia del sistema de ultrafiltración en la potabilización de agua superficial .....	46
4.3 Formación de <i>biofouling</i> durante el proceso de ultrafiltración de agua superficial del río Tena .....	50
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	61
5.1 Conclusiones.....	61
5.2 Recomendaciones .....	63
REFERENCIAS .....	65
ANEXOS .....	73

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Coordenadas geográficas del sitio de muestreo (Ciudad de Tena).....	8
<b>Tabla 2.</b> Modelos de mecanismo de bloqueo de poro y sus descripciones. Los modelos son basados en ecuaciones lineales. ....	17
<b>Tabla 3.</b> Caracterización fisicoquímica de los puntos de muestreo C1 y C2 caracterizado como zona de alta carga. Comparación de parámetros fisicoquímicos empleando membranas de PES (CPM: 100, 30 y 10 kDa). ....	22
<b>Tabla 4.</b> Análisis microbiológico de agua superficial del río Tena en los puntos A2-B2 y C2. ....	23
<b>Tabla 5.</b> Concentración y eficiencia de remoción (%R) de parámetros fisicoquímicos y microbiológicos después de ultrafiltración.....	25
<b>Tabla 6.</b> Promedio de las resistencias de filtración de agua superficial del Río Tena con diferente CPM de membranas de UF sometidas a diferente PTM (10- 40 Psi). ....	28
<b>Tabla 7.</b> Determinación del flujo de permeado inicial y flujo sostenible con membranas de diferente CPM. El flujo sostenible se produjo a partir de los 100 mL. ....	29
<b>Tabla 8.</b> Inicio de bloqueo de poro en función al volumen de permeado para membranas con CPM diferente. ....	30
<b>Tabla 9.</b> Tasa de acumulación de contaminantes fisicoquímicos en la membrana de UF por cada hora filtración. ....	38
<b>Tabla 10.</b> Concentraciones de ADN ambiental extraído a partir de membranas con diferente CPM como parte de la composición del biofouling. ....	39

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Localización geográfica del área de estudio: Cantón Tena, Zona urbana de la ciudad.....	9
<b>Figura 2.</b> Diseño a escala laboratorio del sistema experimental de ultrafiltración. Uso de membranas de polietersulfona (100, 30 y 10 kDa) y nitrógeno gaseoso (N <sub>2</sub> ). .....	12
<b>Figura 3.</b> Concentración de bacterias mesófilas aerobias y coliformes totales en el punto C2 de muestreo. Remoción eficaz de BMA, remoción incompleta de coliformes fecales empleando membranas con CPM diferente. ....	24
<b>Figura 4.</b> Eficiencia de remoción (%) de parámetros fisicoquímicos y microbiológicos después de la ultrafiltración con diferentes CPM para agua superficial del punto C2...	27
<b>Figura 5.</b> Determinación del comportamiento del flujo de permeado volumétrico real para membranas con diferente CPM.....	29
<b>Figura 6.</b> Modelo ajustado para la predicción de la formación de torta durante la formación de biofouling de la membrana.....	31
<b>Figura 7.</b> Comportamiento de la resistencia específica de la torta para membranas con diferente CPM.....	32
<b>Figura 8.</b> Permeabilidad hidráulica de la membrana en función del volumen de permeado con membrana de diferente CPM. ....	33
<b>Figura 9.</b> Porosidad efectiva de la torta depositada sobre la superficie de las membranas con diferentes CPM. Todos los valores de porosidad fueron relativamente bajos en todas las condiciones.....	34
<b>Figura 10.</b> Cálculo de la dimensión fractal a partir de la relación de masa y grosor de la torta para membranas con diferente CPM. En todas las condiciones, la torta alcanzó una estructura tridimensional. ....	35
<b>Figura 11.</b> Distribución y contribución de los mecanismos de bloqueo de poro para coloides. ....	36
<b>Figura 12.</b> Distribución y contribución de los mecanismos de bloqueo de poro para polímeros.....	37

**Figura 13.** Amplificación por PCR convencional (cebadores 27f) de ADNbc a partir de seis membranas de PES (CPM: 100, 30 y 10 kDa), visualizados en electroforesis en gel de agarosa al 1% en TBE.....40

**Figura 14.** Amplificación por PCR convencional (cebadores AQ1 y AQ2) de dsADN a partir de seis membranas de PES (CPM: 100, 30 y 10 kDa), visualizados en electroforesis en gel de agarosa al 1% en TBE. Carriles 1 y 4, membrana de 100 kDa. Carriles 2 y 5, membrana de 30 kDa. Carriles 3 y 6, 10 kDa. ....42

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Área de estudio con puntos de muestreo A (Zona prístina), B (Zona semiurbana) y C (Zona urbana).....	73
<b>Anexo 2.</b> Caracterización fisicoquímica de los puntos de muestreo a lo largo del río Tena A-C.....	74
<b>Anexo 3.</b> Concentración de bacterias mesófilas aerobias y coliformes totales en los puntos de muestreo A-C.....	75
<b>Anexo 4.</b> Amplificación por PCR convencional de ADNg a partir de seis membranas de PES (CPM: 100, 30 y 10 kDa), visualizados en electroforesis en gel de agarosa al 1% en TBE.....	76

## RESUMEN

Los principales impulsores de la aparición de enfermedades virales y bacterianas son los cambios socioeconómicos, demográficos y ambientales. La ciudad de Tena posee una población de alrededor de 25.000 personas, las mismas que se estima que liberen 70 L de agua de agua residual por día. Este vertido continuo, provoca el aumento de las concentraciones de sólidos y nutrientes en los sistemas fluviales; causando una perturbación en las comunidades bacterianas y virales e implicaciones en la salud del ecosistema de agua dulce. La ultrafiltración (UF) ha surgido como una alternativa de bajo consumo para la remoción de agentes contaminantes provocados por el continuo vertido de agua residual. La presente investigación tiene como objetivo identificar los mecanismos de bloqueo de poro de membrana relacionado con el depósito de materia orgánica y compuestos biológicos (bacterias y virus) utilizando membranas con diferente corte de peso molecular (100, 30 y 10 kDa). Se realizó una caracterización fisicoquímica y microbiológica del agua superficial del río, antes y después de la UF para evaluar la eficiencia de remoción de contaminantes. Los resultados indican que el sistema de UF resulta eficiente como un proceso de potabilización secundario para agua superficial altamente contaminada empleando membranas con menor CPM (80% de remoción). Además, se produjo la formación de la torta con una estructura fractal tridimensional la misma, que acumuló contaminantes fisicoquímicos y biomasa bacteriana y viral. En este análisis se muestra la formación de *biofouling* que alberga microorganismos indicadores de contaminación fecal los cuáles son de gran importancia ecológica y de calidad higiénica del agua.

**Palabras claves:** Ultrafiltración, *biofouling*, agua residual, virus, bacterias, remoción.

## ABSTRACT

The main impulses of the appearance of viral and bacterial diseases are the socioeconomic, demographic and environmental changes. The city of Tena has a population of around 25,000 people, who are estimated to release 70 L of wastewater per day. This continuous discharge causes an increase in the concentrations of solids and nutrients in the river systems; causing a disturbance in bacterial and viral communities and implications for the health of the freshwater ecosystem. Ultrafiltration (UF) has emerged as a low-consumption alternative for the removal of pollutants caused by the continuous discharge of wastewater. The present research aims to identify the membrane pore blocking mechanisms related to the deposit of organic matter and biological compounds (bacteria and viruses) using membranes with different molecular weight cutoffs (100, 30 and 10 kDa). A physicochemical and microbiological characterization of the river's surface water was carried out before and after the FU to evaluate the efficiency of pollutant removal. The results indicate that the UF system is efficient as a secondary purification process for highly polluted surface water using membranes with lower CPM (80% removal). In addition, the formation of the cake with a three-dimensional fractal structure occurred, which accumulated physicochemical contaminants and bacterial and viral biomass. This analysis shows the formation of biofouling that harbors microorganisms that indicate fecal contamination. The results are of great ecological importance and the hygienic quality of the water.

**Keywords:** Ultrafiltration, biofouling, wastewater, virus, bacteria, removal.

# CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

## 1.1 Antecedentes

La gran mayoría de los ecosistemas acuáticos se encuentran amenazados por los graves impactos antropogénicos. Los sistemas de agua dulce no son capaces de sobrellevar las perturbaciones de la actividad humana, por lo que las investigaciones relacionadas acerca de la respuesta de los sistemas acuáticos frente a tales impactos son de gran importancia [1]. La descontrolada urbanización cercana a los sistemas fluviales naturales ha creado un desequilibrio en los componentes bióticos del ecosistema acuático. Generalmente, en el sector urbano existe la reutilización de facto de efluentes de EDAR (Estación Depuradora de Aguas Residuales) siendo, una de las contaminaciones más comunes en los sistemas fluviales, el cual incorpora microorganismos y materia exógena a la corriente natural alterando sus patrones ecológicos [2]. De acuerdo con Ricard et. al, 2010 [3], los efluentes pertenecientes a las plantas de tratamiento de agua residual (PTAR) son capaces de alterar la calidad de los ecosistemas fluviales cuando algunos de los compuestos químicos, orgánicos, inorgánicos y biológicos se incorporan al curso de agua como resultado de un proceso deficiente realizado por las PTAR. La contaminación de los ríos se ha venido agravando durante la última década especialmente en las zonas urbanas de las ciudades, donde la condición nativa y natural de las aguas se ha deteriorado significativamente como resultado de un proceso acelerado del desarrollo industrial y crecimiento poblacional [3].

La dinámica existente entre los cuerpos de agua dulce y la descarga del material foráneo de efluentes de las PTAR influyen de manera significativa en la salud del ecosistema acuático y en el desarrollo de los microorganismos existentes en este medio [2]. Así mismo, el fenómeno que se produce entre la interacción del sistema fluvial y la descarga de agua residual sirve como transporte de material disuelto y sólidos suspendidos provenientes de ineficientes procesos de tratamiento de aguas residuales. Dichos elementos contenidos en la corriente de alimentación, pueden ser aprovechados por los microorganismos como sustrato para la obtención de nutrientes [4]. Sin embargo, los macro y micronutrientes del sistema ribérico son esenciales para la supervivencia de los organismos que habitan en los sistemas acuáticos, pero un

aumento en la carga de la materia orgánica puede llevar a problemas de eutrofización y ecotoxicidad [5].

Al entrar en contacto con un sistema fluvial natural, las aguas de desecho de las PTAR le incorporan constantemente nutrientes orgánicos e inorgánicos (tales como, nitratos, fosfatos, amoníaco, sales minerales, detergentes), así como contaminantes biológicos (virus, bacterias y parásitos) y químicos, situación que juega un rol importante en la variación de las propiedades fisicoquímicas y biológicas autóctonas de la corriente [2]. La incorporación continua de material exógeno provoca cambios en las condiciones imperantes del sistema fluvial, lo que a su vez conduce a una paulatina metamorfosis de la composición del agua y de la estructura microbiana que reside en ella. Wetzel R., 2001 [6], menciona que los microorganismos (virus y bacterias) que habitan en los sistemas acuáticos han presentado evidencia de que el vertido continuo de agua residual, incrementan las cargas naturales de carbono y nitrógeno afectando de esta manera a la función de las comunidades microbianas bióticas autóctonas dentro de los ecosistemas de arroyos.

Desde este punto de vista, se conoce que una de las prioridades en el tratamiento de agua superficial de río que se encuentra contaminada por agua residual, es la eliminación de microorganismos patógenos. Sin embargo, a pesar de que la zona urbana posea acceso a un sistema de saneamiento, la mayoría de estas aguas residuales no son tratadas adecuadamente. Es por esta razón, que existen descargas de cantidades significativas de indicadores de contaminación fecal y microorganismos patógenos en los cuerpos de agua receptores, provocando una reducción notoria en la calidad de las fuentes naturales de agua dulce [7]. Los sistemas fluviales contaminados por aguas tratadas inadecuadamente pueden representar un riesgo a la salud humana debido a la presencia de patógenos entéricos, que han causado varias enfermedades transmitidas por recursos hídricos [8]. Se ha evidenciado que el efluente de las aguas residuales que está siendo descargada constantemente en los sistemas fluviales está compuesta por sustancias de origen humano, las mismas que se caracterizan por poseer propiedades de alteración endócrina [9]. Las normas actuales de calidad microbiológica para el agua incluyen a las bacterias coliformes fecales como *Escherichia coli* y virus entéricos humanos para detectar contaminación fecal en el agua. Gracias a este último enfoque

se han realizado varios estudios donde también se demostró que los virus entéricos están presentes en sistemas fluviales que poseen altos niveles de aguas residuales previamente tratadas, por lo que se los considera contaminantes emergentes [10]. Estos microorganismos indicadores proporcionan beneficios sanitarios y ecológicos importantes para levantar información acerca de la salud de las cuencas hidrográficas. Majedul et. al, 2018 [11], aunque menciona que estos no son perjudiciales, su presencia en las aguas superficiales sugiere la existencia de microorganismos patógenos para la salud humana contribuyendo al contagio de enfermedades diarreicas como fiebre tifoidea, hepatitis o gastroenteritis.

En este contexto, de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS) la falta de acceso al agua potable provoca que alrededor del 10% de la población mundial use el agua de río para actividades domésticas ya que, el 32% de la población no tiene acceso a servicios adecuados de saneamiento de la misma [9]. Así también, en el 2012 la OMS estimó que alrededor de 1,8 millones de personas mueren cada año por enfermedades transmitidas por el agua, en donde, la mayoría son niños de países en vías de desarrollo [12]. La salud del consumidor de agua principalmente en Ecuador se ve comprometida cuando bacterias, virus o parásitos contaminan la fuente de agua potable, causando enfermedades de origen hídrico, principalmente por manejo inadecuado de aguas residuales [10]. Por otro lado, se conoce que los ríos del cantón Tena se encuentran contaminados por aguas servidas producto del proceso de la PTAR de la ciudad, afectando de manera significativa a la población tenense, debido a que los habitantes aguas debajo de los efluentes emplean estos recursos hídricos naturales sin ninguna depuración previa como fuente principal de sus actividades cotidianas. Goh et. al, 2014 [11] menciona que la tecnología con aplicación de membranas se encuentra en auge debido a la capacidad que ofrece de mejorar, tanto la calidad del agua como la del tratamiento de la misma. De acuerdo con Gao et. al, [13], se ha evidenciado que la UF es capaz de eliminar sólidos suspendidos, endotoxinas, bacterias y la gran mayoría de virus encontrados en la corriente de agua, razón por la cual las enfermedades vinculadas con los sistemas hídricos podrían prevenirse.

La Ultrafiltración (UF) es considerada como una de las tecnologías de separación más avanzadas, desde la década de 1960 con un amplio espectro de aplicaciones en

concentración, purificación y fraccionamiento de varios productos en la industria biotecnológica. En la industria la UF es considerada como una de las mejores herramientas de desinfección el cual está conducido por presión constante, por el cual las partículas y las especies solubles de elevada masa molecular son retenidas por un mecanismo de exclusión por tamaño concentrando y filtrando especies disueltas o en suspensión [12]. La UF generalmente permite pasar a la mayoría de especies inorgánicas y retiene partículas discretas de materia y especies orgánicas iónicas y no iónicas, dependiendo del corte de peso molecular (CPM) de la membrana. De esta forma, en los procesos de UF se retienen las partículas, los coloides y las bacterias, junto con algunas impurezas orgánicas y virus [13]. Esta tecnología se utiliza ampliamente para mejorar la calidad del agua con la finalidad de que puedan ser reutilizadas o recicladas. Es por esto, que la UF ha sido considerada como una de las opciones más factibles para la depuración de agua contaminada, debido, a su bajo costo en comparación de las técnicas de nanofiltración (NF) y ósmosis inversa (RO), fácil automatización y manejo, pero sobre todo por la capacidad de eliminar la materia orgánica y biológica patógena [14]. Así mismo, los procesos de ultrafiltración por membranas se han convertido en un sistema de tratamiento secundario de agua contaminada bastante prometedor, debido a que permite reducir el número de etapas de tratamiento ofreciendo efluentes parcialmente desinfectados y de elevada calidad físico-química.

La tecnología de membrana tiene como objetivo atender las necesidades y expectativas actuales, es por eso, que la selección de los materiales de la membrana juega un rol importante en la separación de contaminantes [11]. De acuerdo con Howe y Clark, 2002 [15] mencionan que, dentro de las propiedades deseadas para que una membrana de UF sea óptima se encuentran las siguientes características: capacidad de alto flujo, baja tendencia al ensuciamiento y alta tasa de rechazo de materia orgánica y patógenos biológicos. Las membranas poliméricas que presentan excelentes propiedades fisicoquímicas, alta resistencia a la formación de *fouling* y disminución del flujo sin interferir en la resistencia mecánica, han ganado terreno en el área comercial para el tratamiento hídrico. Sin embargo, la integración de *biofouling* en las membranas es la principal limitación que afecta el correcto desarrollo de la ultrafiltración. En el proceso de separación la formación de la primera capa de *biofouling* es indispensable,

puesto que, la generación de la torta empieza por los materiales depositados e incrustados inicialmente, mientras que los siguientes materiales son considerados contaminantes [19]. Este fenómeno de formación de la torta a partir del *fouling* o *biofouling* induce al aumento de la capacidad de retención de la membrana [20], sin embargo, los estudios sobre el tratamiento de aguas superficiales contaminadas mediante ultrafiltración son escasos en comparación de otras técnicas como el biorreactor de membrana y ósmosis inversa, limitando de esta forma el alto potencial de esta técnica [19].

Hoy en día, se encuentran a disposición modelos matemáticos que permiten evidenciar la cantidad, composición, estructura y la etapa de la formación del *fouling* que ha sido depositado en la membrana. Estas aproximaciones matemáticas principalmente son empleadas para identificar si el *biofouling* de la membrana se encuentra relacionado con el bloqueo de poros o si está asociado a la superficie de la formación de la torta [21]. Con respecto a la filtración de membrana realizada a presión transmembrana (PTM) constante y con incrustaciones de *biofouling* de forma esférica, se encuentran ecuaciones que describen la relación que existe entre el volumen de permeado y el tiempo de filtración. Estos modelos matemáticos resultan ser de gran ayuda para interpretar de mejor manera el comportamiento del flujo de permeado y la formación de la torta a partir del *fouling* total, permitiendo aprovechar al máximo la operación del sistema de UF. Una vez identificada la estructura y composición de la torta formada es posible relacionar su contenido con bacterias entéricas y patógenos virales. Wingender, 2011 [22], en su trabajo menciona que las biopelículas se encuentran en todos los ambientes acuáticos entre estos, las aguas superficiales de los ríos actuando como el principal reservorio de microorganismos patógenos y no patógenos. A pesar que los virus patógenos humanos no sean capaces de multiplicarse fuera de sus células huésped, Grondhal et. al, 2014 [23], muestra que estos podrían acumularse en el *biofouling* utilizándolo como una barrera de protección contra la inactivación para después ser liberados en el agua. Es por tal razón, que la UF resulta ser una herramienta eficiente para la remoción de partículas, bacterias y virus.

## **1.2 Planteamiento del problema**

En la ciudad de Tena el recurso hídrico natural se ha visto afectado debido a la creciente demanda de la población e industrialización. En la zona urbana de la ciudad de Tena existe alrededor de 23.000 habitantes, los mismos que se estima que liberen 70 L de agua residual por día [21]. La mayoría de las viviendas aledañas a los sistemas fluviales en la zona urbana del cantón Tena, no poseen un sistema de saneamiento adecuado para este tipo de agua contaminada. Además, esta zona alberga una Planta de Tratamiento de Agua Residual (PTAR) Municipal, la misma que descarga aguas residuales constantemente hacia los sistemas fluviales adyacentes. Este vertido continuo de agua residual provoca el aumento de las concentraciones de sólidos y nutrientes en los sistemas fluviales; causando una perturbación en las comunidades bacterianas y virales e implicaciones tanto en la salud del ecosistema de agua dulce como en la salud de la población que emplea el agua del río como fuente líquida principal. Por esta razón, la ultrafiltración de membrana es considerada como una tecnología prometedora, eficaz y sostenible para sobrellevar el problema de la contaminación del agua superficial de los cuerpos de agua dulce y la potabilización de la misma. Además, la identificación de la diversidad de la ecología microbiana y viral en zonas bajas al efluente receptor de agua residual, resulta ser un indicador de contaminación por alteraciones en los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos producidos por la alta descarga de agua contaminada en los ríos.

## **1.3 Justificación de la investigación**

La escasez de agua potable en la ciudad de Tena se ha convertido en un problema de alto impacto debido al rápido crecimiento de la población junto con la urbanización. El ingreso de contaminantes como materia fecal y nutrientes orgánicos e inorgánicos a los cuerpos de agua altera las poblaciones microbianas y virales en cuanto a su abundancia, por lo que pueden utilizarse como indicadores de contaminación. En la Zona Metropolitana de Tena, hasta el momento no existen estudios que determinen la abundancia, actividad y diversidad de grupos microbianos en ambientes de agua dulce y particularmente aquellos que son impactados por efluentes de aguas residuales. Tanto las viviendas ubicadas en zonas cercanas al río Tena y la PTAR descargan el agua residual

hacia los sistemas fluviales cercanos. Debido a esta continua descarga de efluentes contaminados hacia los sistemas de agua dulce, se requieren estudios acerca del tratamiento óptimo para la desinfección y potabilización del agua superficial del río empleando el sistema de ultrafiltración de membrana. Por esta razón, es necesario evaluar la eficiencia del método propuesto, la contribución del desarrollo del *biofouling* y la identificación de la diversidad bacteriana y viral que se encuentran asociadas al mismo, por efecto del vertido de agua residual. Así, de esta manera prevenir enfermedades de origen hídrico en la población que se beneficia diariamente del agua de río, además de generar información base acerca de un área de estudio que no existe exploración alguna.

## **1.4 Objetivos de la investigación**

### **1.4.1 Objetivo general**

Evaluar la capacidad de remoción de contaminantes fisicoquímicos y microbianos del proceso de UF y su influencia en la formación del biofouling, utilizando agua superficial de un sistema fluvial urbano y membranas de diferentes CPM.

### **1.4.2 Objetivos específicos**

- Determinar los parámetros de operación del proceso de UF utilizando agua superficial del Río Tena y membranas con diferente CPM (100, 30 y 10 kDa).
- Analizar la eficiencia de remoción de contaminantes fisicoquímicos y microbiológicos de un sistema de UF con membranas de diferente CPM para la producción de agua potable.
- Identificar los mecanismos de bloqueo de poro suscitados durante la UF en membranas con diferente CPM y su efecto en los parámetros de operación.
- Caracterizar la composición y estructura del *biofouling* formado en la membrana durante el proceso de UF mediante la identificación de contaminantes de naturaleza orgánica-inorgánica y patógenos biológicos (bacterias y virus).

## CAPÍTULO II: MARCO METODOLÓGICO

### 2.1 Selección del sitio muestreo

La zona de investigación definida para este estudio se encuentra en la provincia de Napo, cantón Tena específicamente en la zona metropolitana de la ciudad. Tena posee una población de 60.880 habitantes, de la cual el 38% ( $\approx 23,307$ ) habitan en el núcleo urbano. El sistema fluvial foco para el desarrollo de este proyecto es el Río Tena, el cual geográficamente se encuentra ubicado en el sector urbanizado de la ciudad y cercano a la Planta de Tratamiento de Agua Residual Municipal (Tabla 1, Figura 1). Es por esta razón que el sitio de estudio es considerado como zona de alta carga de materia orgánica y contaminantes biológicos.

**Tabla 1.** Coordenadas geográficas del sitio de muestreo (Ciudad de Tena).

Puntos de muestreo	X	Y
C1	186769	9890325
C2	187440	9890401

Fuente: Posicionamiento GPS/UTM 18S

### 2.2 Recolección de muestras

Teniendo en cuenta los sitios de muestreo mencionados en la sección 2.1; se recolectó muestras de agua superficial del Río Tena en los puntos mencionados anteriormente (C1-C2) mismos que se encuentran dentro de la mancha urbana de la ciudad. El periodo de análisis contempló un ciclo hidrológico completo comprendido entre los meses de marzo de 2019 y marzo del 2020, el cual constó de un n total de 32 muestras de agua superficial por cada punto de muestreo, con volúmenes de 20 L por cada toma quincenal en el lapso de tiempo ya descrito. Para esto, se empleó envases plásticos que fueron previamente esterilizados con detergente, agua destilada y secado a vapor en la estufa con el fin de evitar contaminación cruzada con el agua recolectada. Finalmente, las muestras fueron transportadas hacia el laboratorio manteniendo la cadena de frío correcta ( $4^{\circ}\text{C}$ ) con el propósito de no causar perturbaciones en los parámetros físicos, químicos y microbiológicos propios del lugar.

## ÁREA DE ESTUDIO

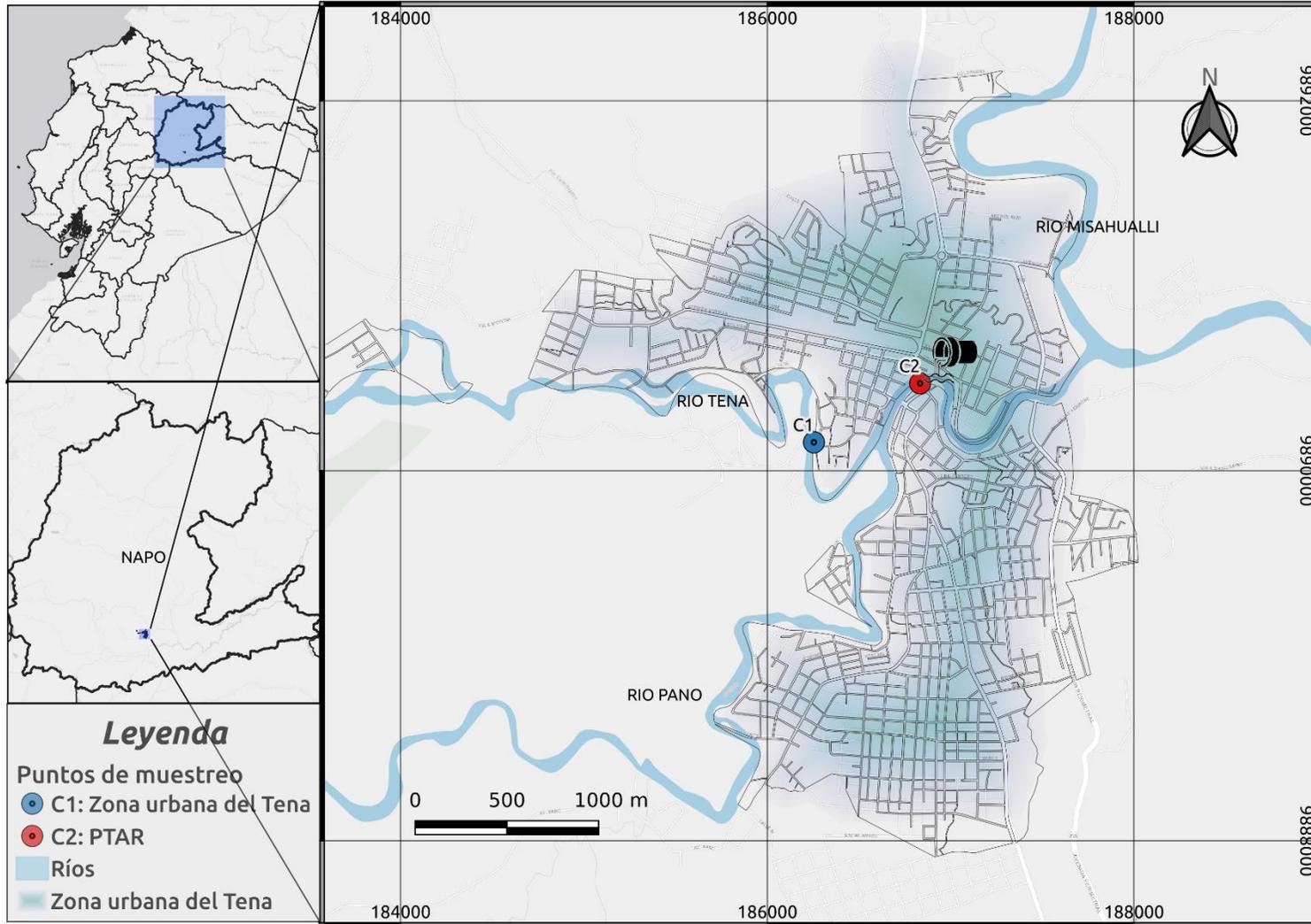


Figura 1. Localización geográfica del área de estudio: Cantón Tena, Zona urbana de la ciudad

### **2.3 Determinación de los parámetros fisicoquímicos de calidad del agua superficial del Río Tena**

En esta fase, se determinaron 20 parámetros fisicoquímicos de muestras de agua superficial de la sección urbana del Río Tena, los mismos que incluyeron análisis *in situ* y *ex situ*. Con respecto a los análisis *in situ* se evaluaron los siguientes parámetros: pH, temperatura y conductividad haciendo uso de una sonda multiparamétrica (pH metro Hanna HI 98127) en el momento de la recolección del agua. Mientras, que los parámetros *ex situ* fueron analizados en el Laboratorio Nacional de Referencia del Agua de la Universidad Ikiam (LNRA) bajo métodos no estándar empleando la técnica de espectrofotometría y usando el kit de Hach (Hach Modelo Dr1900, USA). Finalmente, con el objetivo de evaluar la eficiencia del sistema de UF propuesto se analizaron muestras de agua del punto C1 y C2 después de ser filtradas utilizando membranas con CMP de 100, 30 y 10 kDa. Para esto, se cuantificó las concentraciones de nitritos, nitratos, fosfatos, hierro, amonio, manganeso, color y dureza antes y después de la ultrafiltración. Mientras que la turbidez del agua se midió utilizando un turbidímetro (Hach TL 2300).

### **2.4 Análisis microbiológico de la calidad del agua superficial del Río Tena en la zona de alta carga.**

Las muestras analizadas estuvieron comprendidas por agua superficial del río Tena y agua tratada mediante el proceso de ultrafiltración, utilizando membranas de diferentes tamaños de peso molecular (100, 30 y 10 kDa) con el propósito de marcar un antes y un después de la UF. Es importante mencionar, que las muestras no podían sobrepasar las 12 horas de conservación siempre y cuando se encuentren a temperatura ambiente. Seguidamente, previo a la elaboración de 260 mL de agar MacConkey y Agar Nutritivo se esterilizó el material de cristal a 121°C por 15 minutos. Para realizar el cultivo microbiológico se siguió el protocolo descrito en [25] en donde, se realizó diluciones decimales seriadas de la muestra de agua tratada y no tratada con un volumen de 5 mL por cada dilución. Además, se empleó un tubo con 4,5 mL que contenía solución salina y 0,5 mL de la muestra de agua a sembrar. Posteriormente, se preparó la cámara de bioseguridad con UV por 30 minutos para iniciar la dispensación de los medios de cultivo en 6 cajas Petri para Agar nutritivo y 6 cajas Petri para Agar MacConkey, en donde estuvieron destinadas 2 cajas con medios por cada CPM de membrana. Una vez que los

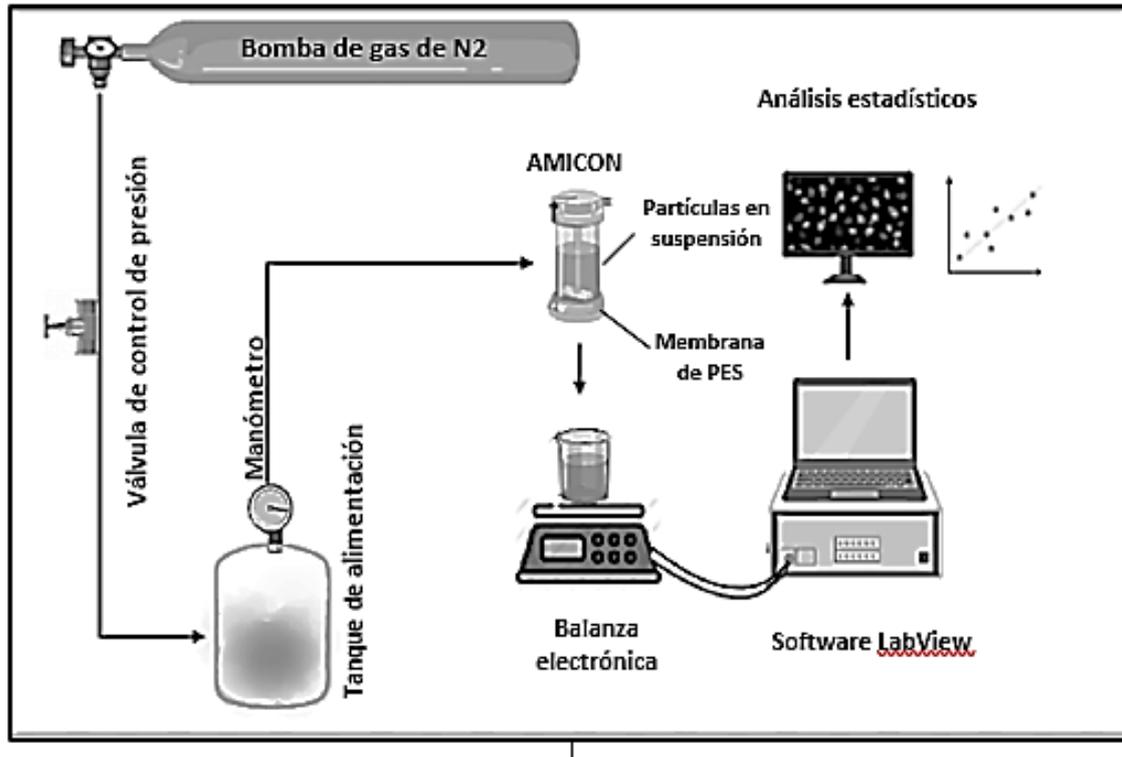
medios se encontraron completamente solidificados se procedió a realizar el estriado, tomando 200 uL y se sembró en la mitad de la placa por extensión homogénea. Con el propósito de evitar contaminaciones, se hermetizó la placa Petri y se incubó a 37°C entre 24 y 48 horas, para identificar el crecimiento tanto de coliformes fecales como de bacterias mesófilas aéreas (BMA). Finalmente, transcurrido el tiempo anteriormente mencionado se contabilizó las colonias formadas en cada una de las placas y se calcularon las Unidades Formadoras de Colonias (UFC), teniendo como base la ecuación (7)

$$UFC = \frac{\text{Número de colonias} \times \text{Factor de dilución (Inverso)}}{\text{Volumen (mL)}} \quad (7)$$

## 2.5 Experimentos de Ultrafiltración

Empleando un tanque de alimentación de acero inoxidable se conectó a una celda comercial de Ultrafiltración (AMICON, UFSC20001, Millipore, MA, USA), la misma que se encontraba cargada con membranas de polietilsulfona para Ultrafiltración (Biomax, Millipore) con distintos tamaños de CPM (CPM; 100, 30 y 10 kDa). Además, se utilizó  $N_2$  presurizado como gas acarreador para generar la fuerza necesaria para llevar a cabo la ultrafiltración. El flujo de permeado fue registrado constantemente usando una balanza electrónica, la misma que, se encontró conectada a un servidor informático que almacenó la información en el software LabVIEW (*Professional development system, National Instruments, TX*) (Figura 2). Previo a la experimentación, se prepararon cada una de las membranas colocándolas en agua desionizada durante 24 horas a 4°C dentro de una caja Petri. Una vez transcurrido este tiempo, se siguió el protocolo previamente descrito usando el sistema de UF y se procedió a la filtración de 1 L de agua desionizada para la compactación de membrana. Posteriormente, se filtró 5 L de agua destilada realizando variaciones de presión entre 10-40 psi (69-275 kPa) con el fin de determinar la resistencia hidráulica de cada membrana que presenta diferente CPM. Dichos valores, se determinaron a partir de los cálculos de la pendiente resultante entre los datos experimentales de flujo de permeado (tiempo, volumen y área de la membrana) y las variaciones de presión (10 – 40 psi). Finalmente, se filtró 20 L de la muestra a presión transmembrana (PTM) constante de 30 psi (207 kPa) utilizando el agua superficial

previamente recolectada, la misma que fue colocada en el interior del tanque de alimentación (Figura 2). Finalmente, se registró el volumen de permeado en función del tiempo en el ordenador conectado al software LabVIEW.



**Figura 2.** Diseño a escala laboratorio del sistema experimental de ultrafiltración. Uso de membranas de polietersulfona (100, 30 y 10 kDa) y nitrógeno gaseoso (N<sub>2</sub>).

## 2.6 Aproximación matemática del fenómeno de ultrafiltración de agua superficial a presión transmembrana (PTM) constante

Previo a la aplicación de la aproximación matemática, fue necesario determinar ciertos parámetros de filtrabilidad del sistema de UF tales como: Flujo inicial, flujo de permeado volumétrico, permeabilidad y resistencia hidráulica y de la torta. Dichos parámetros contribuyeron de manera significativa para describir el proceso de formación del *biofouling* y el desarrollo de la torta. Para llevar a cabo esto, se realizó el tratamiento de los datos brutos obtenidos a través del software LabVIEW (tiempo, volumen de permeado, área de la membrana y PTM). Por otra parte, se tomó como base los valores experimentales del trabajo descrito por Herrera et. al, [18] como son: la concentración de partículas (20 mg/L) y la densidad de las mismas en aguas superficiales (2085 kg/m<sup>3</sup>)

con el fin de determinar algunas de las propiedades estructurales de la torta en formación.

### 2.6.1 Expresiones matemáticas para la determinación de la resistencia hidráulica específica de la torta de membrana.

Siguiendo la ley de Darcy propuestos en [26, 27] y en carencia de una variación en la presión osmótica a través de la membrana, el flujo de permeado se encuentra descrito por la siguiente ecuación:

$$J = \frac{\Delta P}{\mu(R_m + R_c)} \quad (1)$$

donde:  $\Delta P$  indica el diferencial de presión transmembrana,  $\mu$  es la viscosidad dinámica del fluido que está siendo permeado, mientras que  $R_m$  es la resistencia hidráulica de la membrana sin contaminantes y  $R_c$  representa la resistencia de la torta que se está formando en la superficie de la membrana. Por otro lado, la resistencia hidráulica específica de una torta de membrana de espesor  $L$  está descrita como:

$$\hat{R}_c = \frac{R_c}{L} \quad (2)$$

Al tener presentes las ecuaciones (1) y (2) es posible enlazarlas para determinar las propiedades microestructurales que posee la torta usando el modelo de permeabilidad que se indica en la sección 2.6.2. De acuerdo, con estudios realizados acerca de la filtración de la torta, fue posible introducir la resistencia específica de esta en la ecuación (2) basándose en la masa [17, 20]. Esto fue posible, debido a que la masa de la torta está definida como la resistencia hidráulica de la torta ( $R_c$ ) por unidad de masa de la torta ( $M$ ) y por unidad de superficie de la membrana  $A_m$ :

$$\alpha_M = \frac{A_m}{M} R_c \quad (3a)$$

dónde:  $A_m$  posee un valor de  $0.0036 \text{ m}^2$  el mismo que fue determinado experimentalmente [21] y  $M$  es proporcional a  $L$ . Además, las ecuaciones (2) y (3a) indican que las resistencias hidráulicas específicas ( $\hat{R}_c$  y  $\alpha_M$ ) están relacionadas a través de la densidad de la torta ( $\rho$ ), obteniendo lo siguiente:

$$\alpha_M = \frac{\hat{R}_c}{\rho} \quad (3b)$$

Por otro lado, al relacionar las ecuaciones (1) y (3a) y teniendo en cuenta que  $M = C_f V_p$  es el producto entre la concentración de las partículas de la torta y el volumen de permeado es posible obtener una nueva expresión para  $\alpha_M$ . Dicha ecuación viene dada por valores escalares que son cuantificables y medibles experimentalmente mediante el proceso de filtración, en donde se obtiene:

$$\alpha_M = \frac{A_m}{C_f V_p} \left( \frac{\Delta P}{J \mu} - R_m \right) \quad (4)$$

La ecuación (4) resultó ser fundamental para determinar la dependencia que existe entre la resistencia específica de la torta ( $\hat{R}_c$ ) basada en la masa ( $\alpha_M$ ) sobre el tiempo de filtración teniendo en cuenta las mediciones experimentales realizadas acerca del volumen de permeado ( $V_p$ ) que se encuentra en función del tiempo.

Es importante mencionar, que al establecer la masa de la torta como  $C_f \cdot V_p$  se conoce que no existe transporte de reingreso de las partículas que se encuentren cercanas a la superficie de la membrana. Es decir, una vez que las partículas se acerquen a la membrana estas se depositaran sobre ella para iniciar la formación de la torta.

### **2.6.2 Evaluación de la porosidad y dimensión fractal de la torta de membrana basándose en el modelo matemático de Kozeny-Carman**

Tomando como base el modelo de Kozeny-Carman descritas en [28, 29] fue posible realizar la estimación más cercana acerca de la porosidad de la torta de membrana. La misma que establece que la resistencia hidráulica específica de una torta de membrana está definida por lo siguiente:

$$\hat{R}_c^{CK} = K_k \frac{S^2}{\varepsilon^3} \quad (5a)$$

donde:  $K_k$  es la constante de Kozeny y  $S$  representa el área de superficie específica de la torta. Sin embargo, para un mejor entendimiento la ecuación (5a) es reescrita tomando a la dependencia del área del tamaño de partícula, la forma de la misma y la porosidad de la torta, dando como resultado lo siguiente:

$$\hat{R}_c^{CK} = K_k \frac{1}{\varepsilon^2} \left[ \frac{6(1-\varepsilon)}{\psi d_e} \right]^2 \quad (5b)$$

Como se observa en la ecuación (5b), el denominador compuesto por ( $\psi$  y  $d_e$ ) describen la forma y el tamaño de las partículas que forman la torta, aquellas expresiones indican: la esfericidad ( $\psi \leq 1$ ,  $\psi = 1$  para una esfera) y  $d_e$  el diámetro de la esfera equivalente de cada una de las partículas que están siendo depositadas en la membrana. La densidad ( $\rho$ ) y la porosidad de la torta ( $\epsilon$ ) están estrechamente relacionadas a través de la densidad de las partículas ( $\rho_s$ ) con un valor de  $2085 \text{ kg/m}^3$  como  $\rho = \rho_s (1 - \epsilon)$ . Es así, como se acoplan las ecuaciones (3a) y (5a) con el objetivo de representar la resistencia específica de la torta, la misma que se encuentra en función de las propiedades microestructurales de la torta:

$$\alpha_M^{CK} = K_K \cdot \frac{s^2}{\rho_s} \cdot \frac{1}{\epsilon^2(1-\epsilon)} \quad (6a)$$

Si la torta está conformada por partículas esféricas con un tamaño uniforme ( $d_c$ ), la esfericidad y la constante de Kozeny son iguales a 1 y 5, respectivamente; reescribiendo la ecuación (6a) cómo:

$$\alpha_M^{CK} = 180 \cdot \frac{1}{\rho_s d_c^2} \cdot \frac{1-\epsilon}{\epsilon^2} \quad (6b)$$

Por otro lado, con los valores de  $\alpha_M$  obtenidos experimentalmente, se usó la ecuación (7) para obtener un acercamiento a la porosidad promedio de la torta ( $\epsilon$ ) basado en el modelo de Kozeny-Carman, la misma que se encuentra en función del tiempo que dure el experimento de filtración. Una vez que se obtuvo ( $\epsilon$ ), fue posible determinar el grosor de la torta, donde L:

$$L = \frac{C_f V_p}{A_m (1-\epsilon) \rho_s} \quad (7)$$

En los experimentos de filtración, la masa del depósito o *fouling* formado es igual al producto de la concentración de partículas de alimentación ( $C_f$ ) y el volumen de permeado ( $V_p$ ). Bajo estas condiciones, se indica la relación proporcional que existe entre el grosor o altura ( $L$ ) y la masa de la torta ( $M$ ).

Finalmente, una vez identificada la relación entre el grosor de la torta y su masa, fue posible determinar la dimensión fractal de una torta de membrana, basándose principalmente en las características microestructurales y la permeabilidad de la misma.

La dimensión fractal, está dado por ( $D_{torta}$ ) y representa el proceso de formación de la torta, además, indica como su grosor se ajusta con el número de partículas depositadas en la membrana. Mientras, que ( $N$ ) es proporcional a su masa ( $M$ ) [29].

$$L \sim N^\phi = N^{\frac{1}{D_{cake}-2}} \quad (8)$$

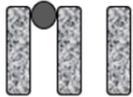
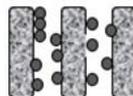
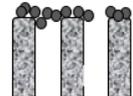
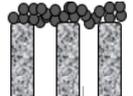
donde:  $\phi$  representa un valor escalar, es decir, la pendiente (a partir de la relación de masa y grosor de la torta) y  $D_{cake} = 2 + \frac{1}{\phi}$  es la dimensión fractal de la torta.

## **2.7 Mecanismo de bloqueo de poro durante la formación de *fouling* en la membrana**

### **2.7.1 Modelos propuestos para determinación de mecanismos de bloqueo de poro para material coloidal y polimérico**

De acuerdo con los estudios de filtración realizados por Hermia [30] se conoce que los modelos de bloqueo de poro se encuentran basados en cuatro leyes básicas de la filtración. Las ecuaciones (Tabla 2) describen el comportamiento de la membrana cuando se realiza una filtración a PTM constante con el flujo de alimentación normal hacia la superficie de la membrana. Cada una de las ecuaciones mencionadas en la tabla 2 refieren a la relación que existe entre el volumen de permeado total ( $V_p$ ), el flujo de permeado volumétrico ( $J$ ), el flujo inicial ( $J_0$ ) y el tiempo de filtración ( $t$ ), para cada uno de los mecanismos de bloqueo de poro identificados. Con respecto a la materia coloidal, el modelo matemático de coloides analiza la suspensión de coloides orgánicos e inorgánicos en la superficie de la membrana durante la UF. Por otro lado, este estudio también evalúa el comportamiento de deposición de la materia polimérica, ya sean, sustancias orgánicas simples o compuestas y residuos de la actividad metabólica microbiana (SPE) que son evaluados a través de un modelo matemático. En el modelo de polímeros, tanto el bloqueo de poros y formación de torta dependen de la variación del peso molecular de cada polímero depositado en la membrana. Cada uno de los modelos descritos anteriormente, explican la relación que existe entre la disminución del flujo con el tamaño de partícula al diámetro de poro [20].

**Tabla 2.** Modelos de mecanismo de bloqueo de poro y sus descripciones. Los modelos son basados en ecuaciones lineales.

Mecanismo de bloqueo	Descripción gráfica	Descripción	Ecuaciones para coloides <sup>a</sup>	Ecuaciones para polímeros <sup>b</sup>
Completo		Obstrucción de poros por partículas sin superposición de partículas	$J = J_0 - K_b V$	$-\ln\left(\frac{J}{J_0}\right) = at + b$
Estándar		Suspensión de partículas dentro de los poros	$\frac{K_s t}{2} = \frac{t}{V_p} - \frac{1}{Q_0}$	$\frac{t}{V_p} = at + b$
intermedio		Algunas partículas que llegan a la superficie de la membrana bloquean un poro	$\frac{1}{J} = \frac{1}{J_0} - K_i t$	$\frac{1}{J} = at + b$
Filtración de torta		Las partículas depositadas no bloquean los poros	$\frac{K_c V}{2} = \frac{2t}{V_p} - \frac{2}{Q_0}$	$\frac{t}{V_p} = aV_p + b$

<sup>a</sup>  $K$  es la constante con el subíndice que indica el mecanismo de bloqueo, dado por Wang y Tarabar [21].

<sup>b</sup> Los parámetros del modelo  $a$  y  $b$  viene dado por Ye et al. [31].

Con respecto a estas ecuaciones matemáticas lineales se realizó un ajuste lineal de mínimos cuadrados para la determinación de los mecanismos de bloqueo de poro para cada tamaño de membrana (100, 30 y 10 kDa).

## 2.8 Extracción, PCR y electroforesis de ADN metagenómico de agua superficial del río Tena.

### 2.8.1 Preparación de filtros

Previa la extracción de ADN se procesó únicamente la mitad de cada uno de los filtros debido a su diámetro. Esta técnica se realizó suponiendo que existe uniformidad en la distribución de la muestra sobre la superficie de la membrana. Posteriormente, se dividió en cuatro cuadrantes para después tomar dos de ellos y cortar en fracciones mucho más pequeñas, las mismas, que fueron colocadas en un microtubo de 1,5mL.

### 2.8.2 Extracción de ADN metagenómico de agua superficial

Protocolo: Kit Wizard® Genomic DNA (Promega) Modificado para eDNA

Inicialmente, se preparó la solución *EDTA*/ Solución de lisis nucleica tomando 120ul de *EDTA* 0,5M (pH 8.0) y 500ul de la solución de lisis disponible en el Kit. Seguidamente, se añadió 600ul de la solución preparada anteriormente a cada tubo de 1,5ml con muestra y se realizó vortex leve. Se adicionó, 17,5ul de 20mg/ml de *Proteinasa K* y se incubó a 55°C por una 1 hora, cada 15 minutos fue necesario realizar vortex hasta observar una completa digestión. Una vez realizada la incubación se añadió 200ul de la Solución de precipitación de proteínas y se ejecutó vigorosamente vortex por 20 segundos, en esta etapa de la extracción de ADN es importante mantener la cadena de frío, es por eso que se enfrió en hielo por 5 minutos. Después, se centrifugó durante 5 minutos a 16000 g a 4°C y se recogió el sobrenadante evitando aspirar trozos de filtro, para después transferir a un tubo limpio de 1,5ml. Cuidadosamente, se removió el sobrenadante que contenía ADN, el mismo que se transfirió a otro tubo de 1,5ml, se agregó 600ul de isopropanol y se mezcló por inversión. Se centrifugó por 2 min a 16000 g a una temperatura de 4°C, se decantó el sobrenadante, seguidamente, se añadió 300ul de etanol al 70% y se realizó un primer vortex para después colocar los 300ul sobrantes de etanol y se realizó un segundo vortex con el objetivo de lavar el ADN. Después, se centrifugó por 2 minutos a 16000 g a 4°C, se decantó el sobrenadante y se invirtió el tubo sobre un papel absorbente durante 12 horas, en ocasiones se usó el termobloque durante 10-15 min con el propósito de secar por completo el pellet. Después, se agregó 40ul de la Solución de rehidratación y 3ul de la solución de *RNAse* y se mezcló por inversión para después enfriar en hielo durante 2 minutos. Finalmente, se incubó a 37°C por 30 minutos y se almacenó el ADN a 4°C. Con respecto a la cuantificación del ADN se utilizó el equipo *Thermo Scientific Nanodrop*. Se dispuso de 2 uL de la solución rehidratante, como blanco de la cuantificación y finalmente, se añadió 2 uL de la muestra de ADN para obtener valores de concentración y pureza.

### **2.7.3 Reacción de cadena polimerasa (PCR) convencional a partir de ADN genómico ambiental**

Todos los oligonucleótidos y reactivos usados en este estudio fueron facilitados por el laboratorio de Biología molecular y bioquímica de la Universidad Regional Amazónica

Ikiam y el Instituto Nacional de Investigación y Salud Pública (INSPI) para la amplificación de 16S y adenovirus. Es importante mencionar que para cada análisis molecular de PCR se empleó 9 muestras (3 por cada CPM de membrana) usando dos diferentes primers y células competentes de *E. coli* como control positivo (+).

**Iniciadores y amplificación por PCR de 16S.** La amplificación se realizó empleando 100 ng de ADN genómico previamente extraído y purificado. Para esto, se empleó el cebador 27f-CM (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') y 1492r (5'-TACCTTGTTACGACTT-3') para la región conservada ubicada entre 16S-23S rADN. Siguiendo el protocolo de amplificación lineal de genes microbianos 16S propuesto por Frank y su equipo [32] las mezclas de reacción contenían 0.1 ng de muestra de ADN en 25 µl de tampón de PCR (Invitrogen) que contenía MgCl<sub>2</sub> 2mM, una concentración 0.2 mM de una mezcla de trifosfato desoxinucleósido, una concentración 200 nM de la variante del primer 27f apropiada y 0.25 unidades de Taqpolimerasa (Invitrogen). Las mezclas de reacción se incubaron durante 4 minutos a 94 ° C, seguidas de ciclos de desnaturalización durante 1 minuto a 94 ° C, el anillaje de primers se dió durante 30 segundos a la temperatura adecuada y extensión durante 2 minutos a 72 °C.

**Iniciadores y amplificación por PCR de Adenovirus.** Para la amplificación de adenovirus se siguió la metodología descrita por Heim en el 2003 [33] usando 100 ng de ADN genómico extraído. Seguidamente, se colocó los cebadores AQ1 (5'-GCCACGGTGGGGTTTCTAAACTT-3') y AQ2 (GCCCCAGTGGTCTTACATGCACATC-3') en el master mix para lograr concentraciones finales de 0.4mM, 0.5mM respectivamente. Así mismo, se agregó 8ul de master mix y 12ul del ADN extraído anteriormente en cada capilar para después, ser centrifugados y colocados en el termociclador. Las condiciones de reacción fueron 10 min a 95°C para activar la Taq-polimerasa, cuarenta y cinco ciclos que consistieron en desnaturalización a 95°C durante 3 segundos, anillaje a 55°C durante 10 segundos y extensión a 65°C durante 60 segundos con un aumento de temperatura de 0.58 °C por cada segundo entre la fase de anillaje y el de extensión.

### **2.8.3 Electroforesis en gel de agarosa**

El producto final de la PCR fue sometido a los corridos electroforéticos en gel de agarosa al 1%, con un marcador de peso molecular de 100 pb (100 bp DNA Ladder, Invitrogen).

La calidad e integridad del ADN extraído, se analizó por electroforesis en gel de agarosa, al 1%, (0,2 g Agarosa y 20 ml de buffer, p/v) utilizando el tampón TBE (10X) (Tris, Borato, EDTA). Se tomó 9ul de cada muestra de ADNg extraído y 1ul de tampón de carga (Azul de bromofenol) para la preparación de las muestras. Seguidamente, se cargó en 9 pocillos 10ul de la mezcla anterior y 3ul como marcador de peso molecular para la escalera de referencia. La separación del ADN se realizó en una cámara de electroforesis, empleando un voltaje de 60-100 V durante 45 minutos. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (0,5 ug/mL). Las bandas de ADN se visualizaron mediante el sistema Gel Doc 1000 (BioRad).

#### **2.8.4 Estimación de Biomasa a partir de ADN**

La aproximación de la masa celular adherida en la capa del *biofouling* se realizó siguiendo la investigación realizada por Herrera-Robledo et al. [34]. Se estableció una relación de ADN/biomasa suponiendo que cada  $\mu\text{g}$  de ADN representa 16.6  $\mu\text{g}$  de biomasa celular así como lo mencionó estableció Flemming et al. [35]. Este enfoque consideró que el ADN aislado en se encontraba directamente relacionado con células viables. Además, se estimó empíricamente el número de células bacterianas retenidas en las membranas de diferentes tamaños, utilizando la hipótesis de que una célula bacteriana corresponde a una masa celular unitaria de 0.29 pg por célula.

### **2.9 Análisis estadístico**

Para el tratamiento de datos y análisis de resultados obtenidos en cada fase experimental, se calculó la media y la desviación estándar de cada uno de los parámetros evaluados en el sistema de UF, ya antes mencionados. Cada uno de los modelos de los mecanismos de poro fueron obtenidos aplicando un ajuste lineal de mínimos cuadrados, además, se calculó el error de cada uno con un intervalo de confianza del 95% para cada experimento. En donde, es posible visualizar que domina un solo mecanismo de bloqueo de poro. Todos los análisis se realizaron utilizando la plataforma de libre acceso RStudio 1.3.

## CAPÍTULO III: PRESENTACIÓN DE DATOS Y RESULTADOS

En el presente capítulo se da a conocer los resultados obtenidos en el desarrollo de la investigación, los mismos que abarcan los hechos encontrados más relevantes de este estudio para el área seleccionada.

### 3.1 Caracterización fisicoquímica del agua superficial de la zona urbana del río Tena

Es posible evidenciar en los parámetros fisicoquímicos valores significativos de diferentes contaminantes emergentes que indican una deficiente o baja salud del río Tena específicamente en la zona urbana del cantón (Tabla 3). Se estableció que los puntos de muestreo denominados como C1 y C2 sean considerados como zona de alta carga de polución de acuerdo con el número aproximado de habitantes y la PTAR que se encuentran cercanas al sistema fluvial Tena en la mancha urbana de la ciudad.

Los resultados del análisis fisicoquímico de este punto de muestreo fueron comparados con los valores establecidos en el Texto Unificado de Legislación Secundaria de Medio Ambiente, norma de calidad ambiental y descarga de efluentes: recurso agua. Libro Vi, (TULSMA) para aguas de consumo humano y uso doméstico, que únicamente requieran tratamiento convencional [30]. La comparación realizada en la Tabla 3 indica que la concentración de nutrientes ( $<1,36 \text{ mgL}^{-1}$ ) y metales ( $<2,57 \text{ mgL}^{-1}$ ) se encuentran bajo el límite máximo permisible. Sin embargo, la concentración de fosfatos y hierro presentes en el cuerpo de agua en ambos puntos de muestreo excedieron los límites máximos permisibles dictados por el TULSMA con concentraciones de  $1,36 \text{ mgL}^{-1}$  y  $0,30 \text{ mgL}^{-1}$  respectivamente. Además, es posible observar que la cantidad de nitratos ( $0,006 \text{ mgL}^{-1}$ ) a pesar de encontrarse bajo los estándares establecidos ( $0,1 \text{ mgL}^{-1}$ ) su presencia en el río Tena (C1 y C2) es de valor significativo. Finalmente, uno de los parámetros nefelométricos cuantificados *in situ* importante en este estudio, es el color, mismo que presenta una tasación relevante (53 Pt/Co en la Escala Hazen) para la salud de del río a pesar de encontrarse bajo los LMP dictados por el TULSMA.

Una vez analizada la carga de contaminantes presentes en zonas prístinas (A) y semiurbanas (B) del río Tena se establecen las concentraciones de los parámetros

fisicoquímicos de los puntos C1 y C2 (foco de estudio) en la tabla 3, por lo que la información de los puntos A y B puede ser revisada en el (Anexo 2). Cabe recalcar que este estudio fue realizado en conjunto con los miembros del grupo de investigación *Hi-Water*.

**Tabla 3.** Caracterización fisicoquímica de los puntos de muestreo C1 y C2 caracterizado como zona de alta carga. Comparación de parámetros fisicoquímicos empleando membranas de PES (CPM: 100, 30 y 10 kDa).

Parámetros (SI)	Unidades	Nº	Punto C1	Punto C2	LMP*	Norma
<b><i>In Situ, nefelometría</i></b>						
Temperatura	(°C)	32	21.75 ± 0.46	23,35 ± 0.58	± 3 grados	TULSMA
Conductividad	µs cm <sup>-1</sup>	32	27.50 ± 0.62	29,65 ± 1.00	NA	NE
pH	Und	32	7.58 ± 0.14	7.96± 0.23	6 a 9	TULSMA
Turbidez	NTU	32	2.493 ± 0.09	12,7 ± 5,272	100	TULSMA
Color	Escala Hazen, Pt/Co	32	11.67 ± 1.15	53 ± 21,703	100	TULSMA
<b>Nutrientes</b>						
Nitritos <sup>b</sup>	mgL <sup>-1</sup>	32	0.006 ± 0.001	0,006 ± 0,002	1.0	TULSMA
Nitratos	mgL <sup>-1</sup>	32	0.7 ± 0.058	0,6 ± 0,361	10.0	TULSMA
Amoniaco	mgL <sup>-1</sup>	32	0.17 ± 0.001	0,437 ± 0,08	1.0	TULSMA
Fosfatos	mgL <sup>-1</sup>	32	1.36 ± 0.012	0,353 ± 0,186	0.1	TULSMA
<b>Metales y Dureza</b>						
Manganeso	mgL <sup>-1</sup>	32	0.05 ± 0.005	0,033 ± 0,022	0.3	TULSMA
Hierro	mgL <sup>-1</sup>	32	0.30 ± 0.002	0,213 ± 0,067	0.1	TULSMA
Dureza-Calcio	mgL <sup>-1</sup>	32	10.13 ± 0.412	3,12 ± 0,236	500	TULSMA
Dureza-Magnesio	mgL <sup>-1</sup>	32	2.32 ± 0.042	2,577 ± 0,267	500	TULSMA

\* Límite máximo permisible para aguas de consumo humano y uso doméstico, que únicamente requieran tratamiento convencional. \*\* Temperatura ambiente en el Laboratorio Nacional de Referencia de Calidad de Agua-Ikiam NE: No establecido. NA: No asignado

### 3.2 Caracterización microbiológica de agua superficial del río Tena

A través de un análisis estadístico univariado se determinó el nivel de contaminación bacteriana asociada a los puntos de muestreo A2- B2 y C2 ubicados a lo largo del río

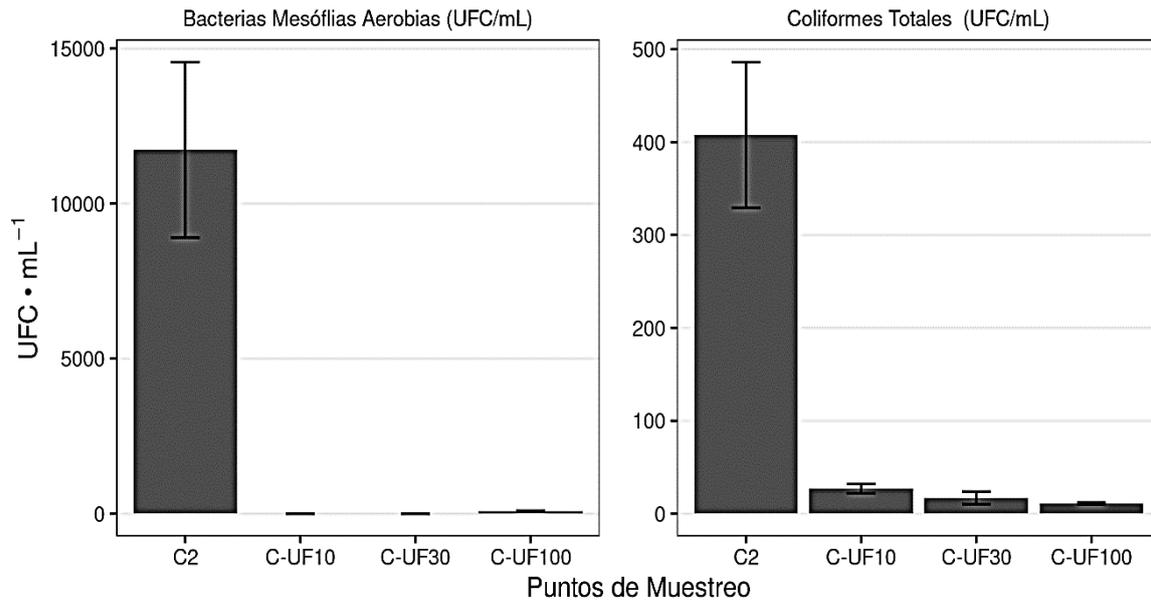
Tena (Anexo 1). Como se observa en la tabla 4, los resultados de recuentos de unidades formadoras de colonias fueron significativamente diferentes entre los tres puntos de muestreo tanto para BMA y coliformes debido a las zonas geográficas muestreadas: Punto A2 (Zona prístina), Punto B2 (Zona semiurbana) y Punto C2 (Zona urbana) (Anexo 1). Se determinó, al punto C2 como la zona con mayor carga de contaminantes microbiológicos en comparación a los puntos A2 y B2. Las cuantificaciones de las unidades formadoras de colonias indicaron que las muestras de agua superficial cruda del punto C2 fueron catalogadas como no aptas para el consumo humano sin un tratamiento previo, debido a la alta presencia de contaminación microbiológica de origen fecal.

**Tabla 4.** Análisis microbiológico de agua superficial del río Tena en los puntos A2-B2 y C2.

Parámetros	Unidades	Muestras	Punto A2	Punto B2	Punto C2	Límite Máximo Permisible (LMP) <sup>a</sup>	Norma
<b>Bacterias Mesófilas Aerobias (BMA)</b>	UFC· mL <sup>-1</sup>	6	1.1x10 <sup>3</sup> ± 29	18.5x10 <sup>3</sup> ± 3670	11733x10 <sup>6</sup> ± 2.02	NA	NE
<b>Coliformes totales</b>	UFC· mL <sup>-1</sup>	6	<1	60 ± 12.23	40,78±0,04	<3000	TULSMA

<sup>a</sup> Límite máximo permisible para aguas de consumo humano y uso doméstico, que únicamente requieran tratamiento convencional. NA: valor no asignado; NE: no establecido.

Con respecto a la Figura 3 se observa que el punto C2 presenta UFC de BMA con cantidades similares a las UFC correspondientes a coliformes fecales antes de ser sometidos al proceso de UF, indicando una salud deficiente del sistema fluvial. Sin embargo, una vez que se aplica la ultrafiltración se observó que las UFC de BMA son removidas eficazmente con los tres tipos de membranas (CPM: 100, 30 y 10 kDa). En contraste, con las UFC de coliformes fecales, en donde a pesar de encontrarse bajo los LMP establecidos por el TULSMA indica la presencia de desechos fecales de origen humano y animal.



**Figura 3.** Concentración de bacterias mesófilas aerobias y coliformes totales en el punto C2 de muestreo. Remoción eficaz de BMA, remoción incompleta de coliformes fecales empleando membranas con CPM diferente.

### 3.3 Remoción de parámetros fisicoquímicos y microbiológicos del agua superficial del río Tena por el sistema de ultrafiltración

Empleando membranas con diferentes CPM se evaluó la eficiencia de remoción de contaminantes presentes en el río. Con el propósito de analizar la eficiencia de remoción se tomó muestras únicamente del punto C2, considerado como la zona con mayor carga de contaminantes en comparación con C1 de acuerdo con los resultados fisicoquímicos y microbiológicos obtenidos previamente; además, de la desembocadura de la PTAR municipal en esta zona del río. Como se muestra en la tabla 5, las concentraciones de los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos del agua superficial se redujeron de una manera mínima para la membrana de 100 kDa. Sin embargo, al emplear membranas con menor CPM (30 y 10 kDa) se observó una reducción de contaminantes mucho más significativa (80%). Las nuevas concentraciones de los parámetros obtenidas después de la UF con membranas de 30 y 10 kDa se encontraron dentro de los LMP para agua potable establecidos por el Instituto Ecuatoriano de Normalización (INEN 1108:2011).

**Tabla 5.** Concentración y eficiencia de remoción (%R) de parámetros fisicoquímicos y microbiológicos después de ultrafiltración.

<sup>a</sup> Las unidades de medida de estos parámetros son iguales a los establecidos en la tabla 3.

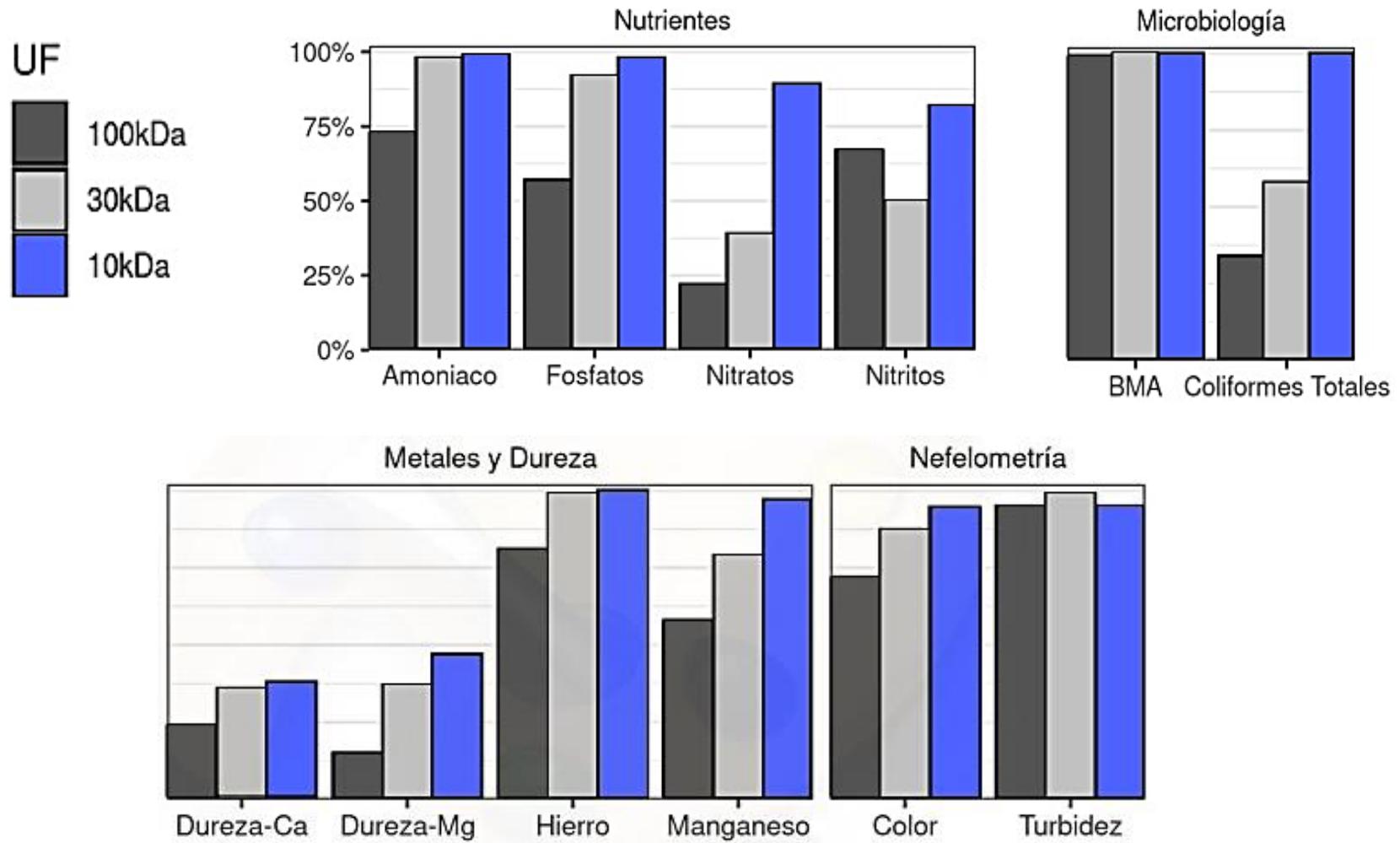
<sup>b</sup> El límite de detección para nitritos fue de 0.002 mgL<sup>-1</sup>

Parámetros (SI)	N° Muestras	Punto C2	UF-100 kDa MWCO	% R	UF-30 kDa MWCO	% R	UF-10 kDa MWCO	% R
<b>In situ, Nefelometría</b>								
pH	32	7.96± 0.23	7,55± 0.13	NA	7,53± 0.18	NA	7,10± 0.23	NA
Turbidez (NTU)	32	12,7 ± 5,272	0,604 ± 0,466	95	0,156 ± 0,033	99	0,031 ± 0,053	95
Color (Escala Hazen, Pt/Co)	32	53 ± 21,703	14,667 ± 3,512	72	7 ± 2,646	87	2,667 ± 3,055	95
<b>Nutrientes</b>								
Nitritos (mg/L)	32	0,006 ± 0,002	0,002 ± 0,001	67	0,003 ± 0,001	50	0,001 ± 0,002	82
Nitratos (mg/L)	32	0,6 ± 0,361	0,467 ± 0,289	22	0,367 ± 0,153	39	0,067 ± 0,058	89
Amoníaco (mg/L)	32	0,437 ± 0,08	0,12 ± 0,101	73	0,007 ± 0,012	98	0,003 ± 0,006	99
Fosfatos (mg/L)	32	0,353 ± 0,186	0,153 ± 0,055	57	0,027 ± 0,006	92	0,007 ± 0,012	98
<b>Metales y Dureza</b>								
Manganeso (mg/L)	32	0,033 ± 0,022	0,014 ± 0,009	58	0,007 ± 0,001	79	0,001 ± 0,001	97
Hierro (mg/L)	32	0,213 ± 0,067	0,04 ± 0,017	81	0,003 ± 0,006	99	BDL	100
Dureza-Calcio (mg/L)	32	3,12 ± 0,236	2,38 ± 0,643	24	2 ± 0,960	36	1,977 ± 0,856	37
Dureza-Magnesio (mg/L)	32	2,577 ± 0,267	2,197 ± 0,146	15	1,623 ± 0,548	37	1,363 ± 0,566	47
<b>Microbiología</b>								
Bacterias Mesófilas Aeróbicas (UFC/mL)	6	11733x10 <sup>6</sup> ± 1,03	88x10 <sup>3</sup> ± 2,02	99	NBO	100	NBO	100
Coliformes totales (UFC/mL)	6	1,61 ± 0,04	1,41 ± 0,03	34	1,37 ± 20,13	58	1,47 ± 1,24	100

<sup>c</sup> El límite de detección para amoníaco fue de 0.02 mgL<sup>-1</sup>

<sup>d</sup> El límite de detección para manganeso fue de 0.003 mgL<sup>-1</sup>. NBO: Ninguna bacteria observada; BLD: bajo el límite de detección. Números entre paréntesis indican la remoción de bacterias en unidades logarítmicas base 10.

Con respecto a la Figura 4, existen diferencias en la eficiencia de remoción de contaminantes fisicoquímicos dependiendo del CPM de las membranas utilizadas. Se observa, que es posible alcanzar hasta el 80% y 90% para las membranas de 30 y 10 kDa respectivamente. Mientras, que la membrana de 100 kDa presentó bajos porcentajes de eficiencia de remoción debido a su mayor CPM, indicando así una mayor transferencia de materia orgánica y biológica hacia el volumen final de permeado. Así mismo, se observa que al tratarse de contaminantes microbiológicos como coliformes fecales totales ninguna de las tres membranas con diferente CPM tiene una eficiencia de remoción considerable ya que, alcanza con un máximo del 60% para la membrana de 10 kDa. Por otra parte, al tratarse de BMA presentes en las muestras estas, fueron removidas con una efectividad en los tres tipos de filtros de membrana empleados (Tabla 5).



**Figura 4.** Eficiencia de remoción (%) de parámetros fisicoquímicos y microbiológicos después de la ultrafiltración con diferentes CPM para agua superficial del punto C2.

### 3.4 Rendimiento del sistema de ultrafiltración en la potabilización de agua superficial

#### 3.4.1 Resistencia y permeabilidad de membranas con diferente CPM (100, 30 y 10 kDa)

Los parámetros de filtración como: resistencia hidráulica de la membrana y de la torta, flujo inicial, flujo de permeado volumétrico y permeabilidad fueron determinados a PTM constante (207 kPa), empleando datos numéricos basados en los experimentos de UF y las ecuaciones mencionadas en la metodología.

Con respecto a los valores de resistencia hidráulica obtenidos para las membranas de 100, 30 y 10 kDa se observa en la tabla 6. Se evidenció que la membrana de 100 kDa presentó los valores de resistencia más altos en comparación de las otras dos membranas. Por otro lado, la membrana de 30 kDa no cumplió en su totalidad la condición inversa entre resistencia y CPM debido a que presentó un valor más pequeño que la membrana de 10 kDa.

**Tabla 6.** Promedio de las resistencias de filtración de agua superficial del Río Tena con diferente CPM de membranas de UF sometidas a diferente PTM (10- 40 Psi).

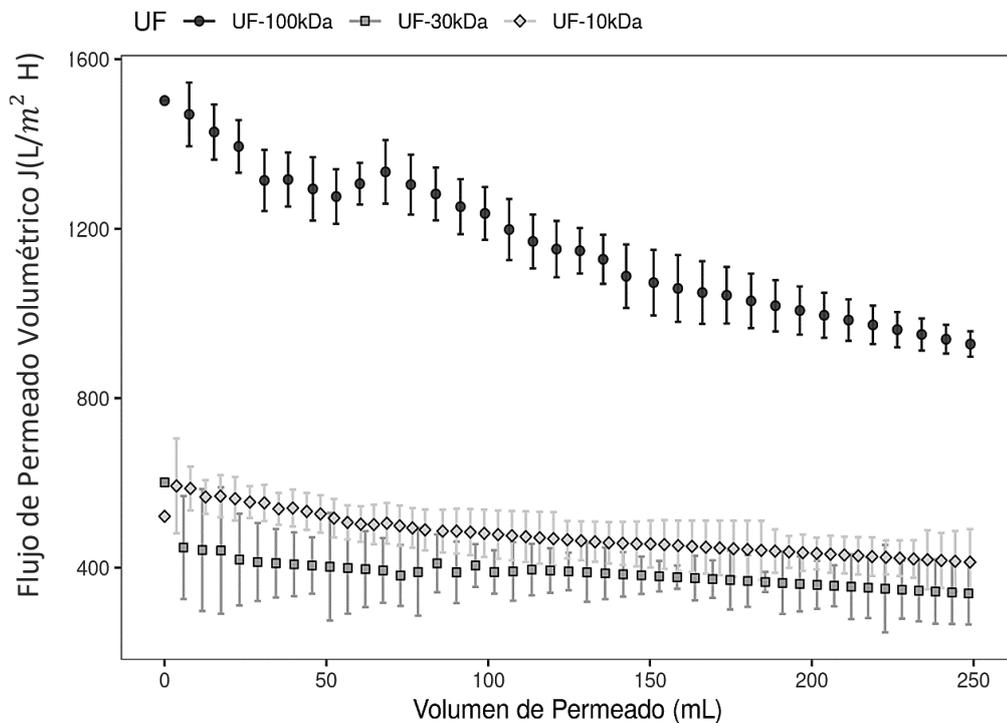
PTM: 10 – 40 Psi (~ 70 - 300 kPa)	
CPM	R <sub>membrana</sub> 10 <sup>11</sup> (m <sup>-1</sup> )
UF-100 kDa	3,31 ± 6,42
UF-30 kDa	1,43 ± 7,73
UF-10 kDa	1,55 ± 6,69

De acuerdo a la Tabla 6 la membrana de 100 kDa es aquella que posee mayor resistencia, por ende, influirá de manera significativa en los parámetros de filtrabilidad, además del flujo de permeado y la permeabilidad hidráulica de la misma. Es por esta razón, que la membrana de 100 kDa muestra un menor flujo inicial, además de empezar un flujo sostenible a menores volúmenes de permeado en comparación de las membranas de 30 y 10 kDa (Tabla 7).

**Tabla 7.** Determinación del flujo de permeado inicial y flujo sostenible con membranas de diferente CPM. El flujo sostenible se produjo a partir de los 100 mL.

CPM	Flujo inicial, $J_0$ (L/m <sup>2</sup> h)	Volumen con flujo sostenible (mL)	Inicio de Flujo sostenible, $J$ (L/m <sup>2</sup> h)
UF-100 kDa	1502,3 ± 0	139,11 ± 20.12	1093,8 ± 30.10
UF-30 kDa	601,3 ± 0	110,6 ± 15.3	396,8 ± 20.03
UF-10 kDa	501,0 ± 0	88,1 ± 5.3	484,7 ± 21.05

Por otro lado, la figura 5 muestra los datos sin tratar o crudos de flujo de permeado sometido a volúmenes de permeado específicos. Así también, se observa el decrecimiento del flujo a medida que el volumen de permeado aumenta cuando se encuentra el sistema trabajando a PTM constante (30 psi). Además, se evidencia la disminución del flujo de permeado antes de los 100 ml dirigido por la membrana de 100 kDa y seguido por la de 10 kDa y 30 kDa hasta alcanzar un flujo totalmente constante hasta los 250 mL. Teniendo en cuenta esta información para la figura 5, se considera flujo sostenible una vez que el flujo de permeado se encuentre en estado estacionario.



**Figura 5.** Determinación del comportamiento del flujo de permeado volumétrico real para membranas con diferente CPM.

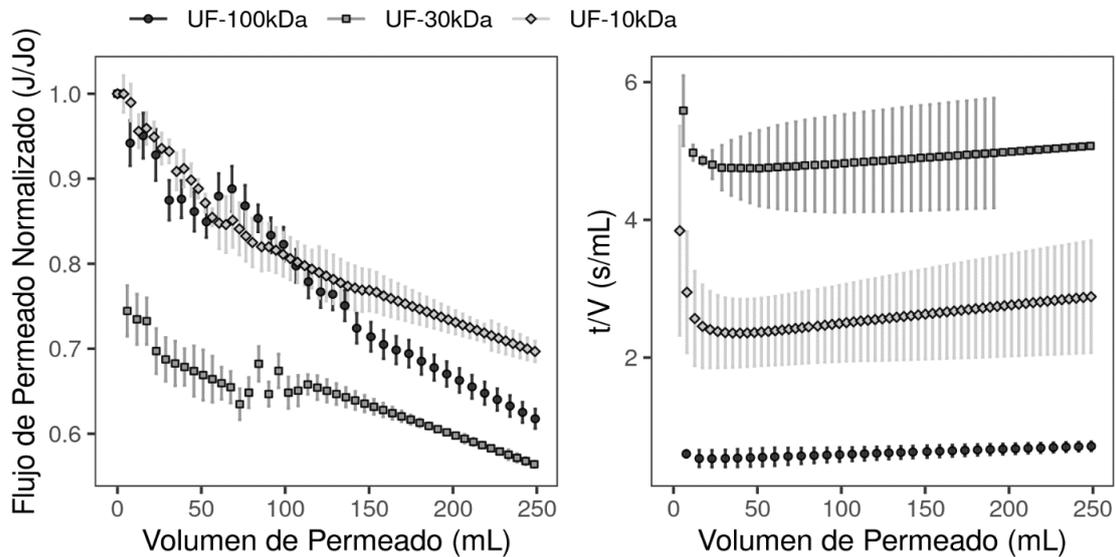
Es importante mencionar que las tasas de pérdida de flujo describen la pendiente negativa del flujo de permeado volumétrico a determinados volúmenes. Por lo tanto, las membranas de menor CPM experimentan mayores tasas de pérdida de flujo hasta los 100 mL de filtración y posteriormente las tasas de pérdida dejan de ser significativas (Figura 5). A partir de esta información, se considera como flujo sostenible cuando el flujo de permeado se encuentra en estado estacionario, un comportamiento lineal con pendiente casi nula (posterior a los 100 mL). Partiendo del flujo de permeado volumétrico real como base, la figura 6 indica el ajuste de estos datos con el objetivo de identificar la formación de la torta relacionando dos parámetros claves: Figura 6a. Flujo de permeado normalizado  $dV/dt$  y Figura 6b. Flujo acumulado inverso  $t/V$  en función del volumen de permeado para membranas con diferentes CPM. Con respecto a la Figura 5a es posible observar un comportamiento de las membranas similar al flujo de permeado volumétrico, ya que, esta muestra una disminución notoria para 30 kDa. Sin embargo, la membrana de 10 kDa adoptó un comportamiento bastante parecido a la membrana de 100 kDa, esto podría deberse a las resistencias hidráulicas calculadas en los experimentos de UF (Tabla 8) en donde, la membrana de 100 kDa presenta el mayor valor seguido por la membrana de 10 kDa.

Por otro lado, la figura 6b muestra una linealidad de  $R^2 \geq 0.9995-0.9998$  presentando pendientes positivas cuando se encuentran a determinados volúmenes, los mismos que van a depender del CPM de la membrana utilizada. Dicho comportamiento está directamente relacionado con el mecanismo de filtración de torta el cual, predominó en las etapas finales. Mientras que el comportamiento en las etapas iniciales que dominó fue el bloqueo de poro (completo, estándar o intermedio) en un volumen de permeado menor a los 100 mL para la membrana de 10 kDa a partir de este volumen se asume la formación de torta.

**Tabla 8.** Inicio de bloqueo de poro en función al volumen de permeado para membranas con CPM diferente.

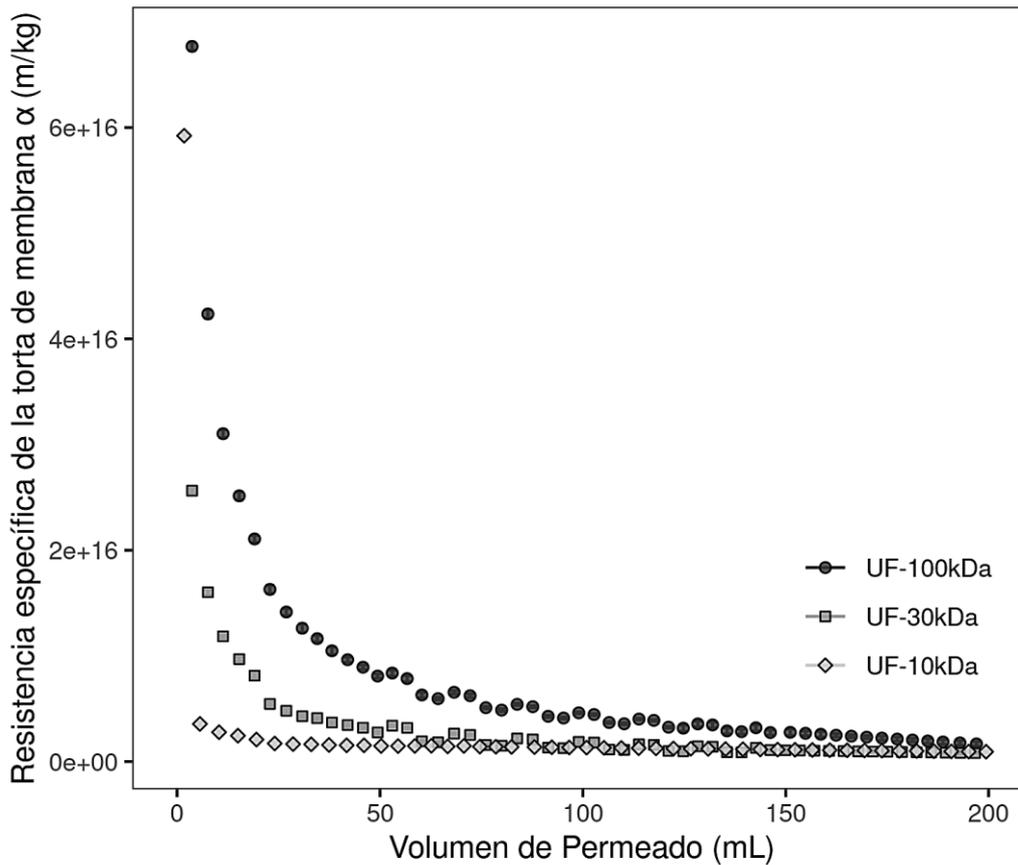
CPM	Inicio de bloqueo de poro (mL)
UF-100 kDa	154,87 ± 0
UF-30 kDa	131,95 ± 0
UF-10 kDa	82,43 ± 0

Los resultados presentados en la tabla 8 fueron obtenidos mediante el ajuste de datos punto por punto hasta que el cuadrado del coeficiente de correlación de Pearson ( $R^2$ ) se encuentre entre 0.9995 y 0.9998.



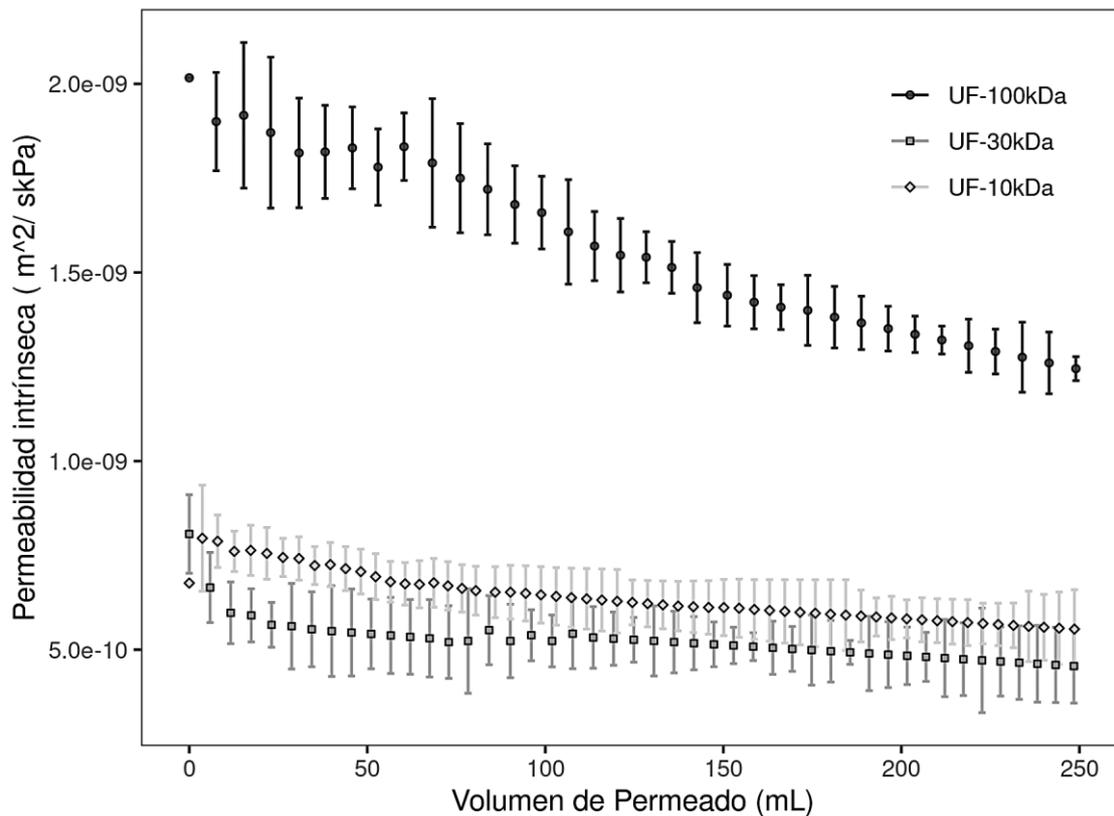
**Figura 6.** Modelo ajustado para la predicción de la formación de torta durante la formación de biofouling de la membrana.

Con respecto, a la figura 7 indica el comportamiento de la resistencia específica de la torta y las variaciones de la misma durante la filtración para membranas con diferentes CPM. Donde, la membrana de 100 kDa presentó una resistencia específica de la torta mayor en comparación a las membranas de 30 y 10 kDa. Para la membrana de 10 kDa se evidenció una relación inversa entre el flujo de permeado volumétrico normalizado y la resistencia específica de la torta. Así también, se esperaba que a medida que se reduce el tamaño de poro, aumente la resistencia. Sin embargo, el comportamiento de la figura 7 no cumple esta lógica pues, la membrana con menor tamaño de poro presenta una menor resistencia específica de la torta en comparación con las membranas de 30 y 100 kDa. Es importante mencionar, que este comportamiento va a depender directamente de la cantidad de partículas depositadas en la membrana y del tamaño de poro de la misma es por esto, que la composición de la fuente de alimentación juega un rol importante para la determinación de dichos parámetros.



**Figura 7.** Comportamiento de la resistencia específica de la torta para membranas con diferente CPM.

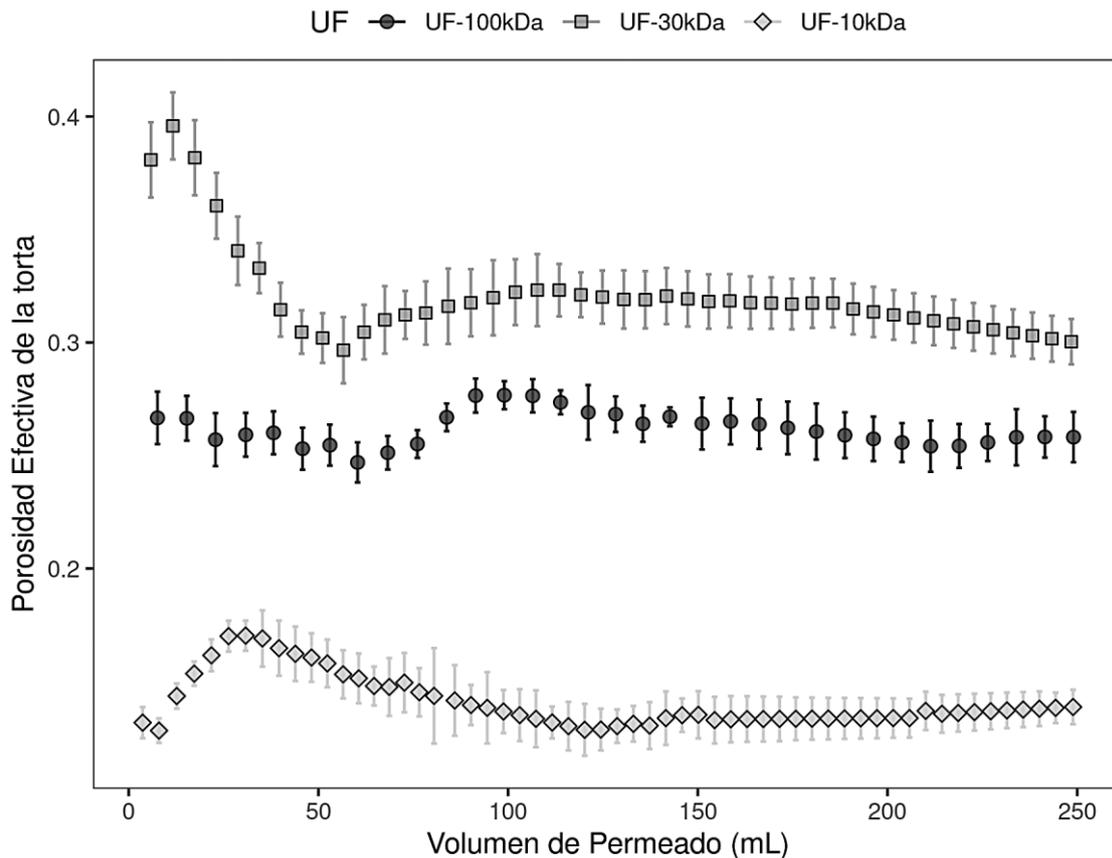
Tanto la resistencia como la permeabilidad hidráulica se encuentran directamente relacionadas puesto que, cuando existen valores altos de resistencia de membrana y específica de la torta, se convierte en un indicador de baja permeabilidad hidráulica de la membrana (Figura 8). Sin embargo, este comportamiento solo es posible observar en las membranas de 30 y 10 kDa con valores entre  $6 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s kPa}$  y  $8 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s kPa}$  respectivamente. Mientras, que la membrana de 100 kDa no siguió esta lógica ya que, presentó los valores más altos de resistencia y de permeabilidad hidráulica con un máximo de  $2 \times 10^{-9} \text{ m}^2 / \text{s kPa}$ . Así mismo, se observa que a medida que aumenta el tiempo de filtración la permeabilidad disminuye, debido a que la materia orgánica y biológica que están siendo depositados continuamente en la membrana afectan de manera significativa en el comportamiento de estos parámetros.



**Figura 8.** Permeabilidad hidráulica de la membrana en función del volumen de permeado con membrana de diferente CPM.

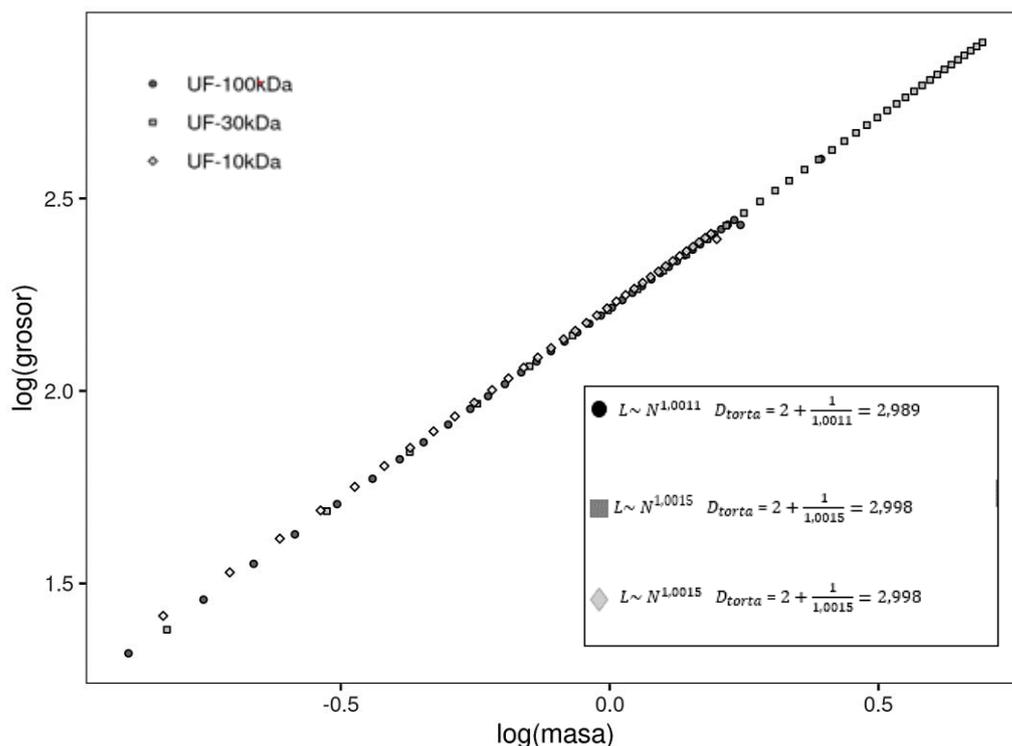
### 3.4.2 Porosidad y estructura de la torta en el desarrollo general de *fouling*

La figura 9 indica el comportamiento de la porosidad de la torta siguiendo las ecuaciones de Kozeny-Carman. Debido a la relación que existe entre las variables de volumen de permeado y porosidad de la torta es posible estimar la porosidad efectiva durante la formación de la torta cuando se encuentra a diferentes volúmenes de permeado. La figura 8 indica un aumento de la filtración en la etapa inicial, sin embargo, rápidamente esta empieza a disminuir hasta mantenerse constante. Posteriormente, la porosidad de la torta presentó un decrecimiento en las fases iniciales del experimento hasta que alcanzó un valor estacionario. Es decir que, al trabajar con una corriente de alimentación con partículas densas al inicio de la filtración la deposición de la materia en la superficie de la membrana fue brusca, taponando los poros rápidamente. Es por esta razón que, al existir más deposición de partículas se creó una estructura más compacta hasta la formación de una torta con una estructura tridimensional.



**Figura 9.** Porosidad efectiva de la torta depositada sobre la superficie de las membranas con diferentes CPM. Todos los valores de porosidad fueron relativamente bajos en todas las condiciones.

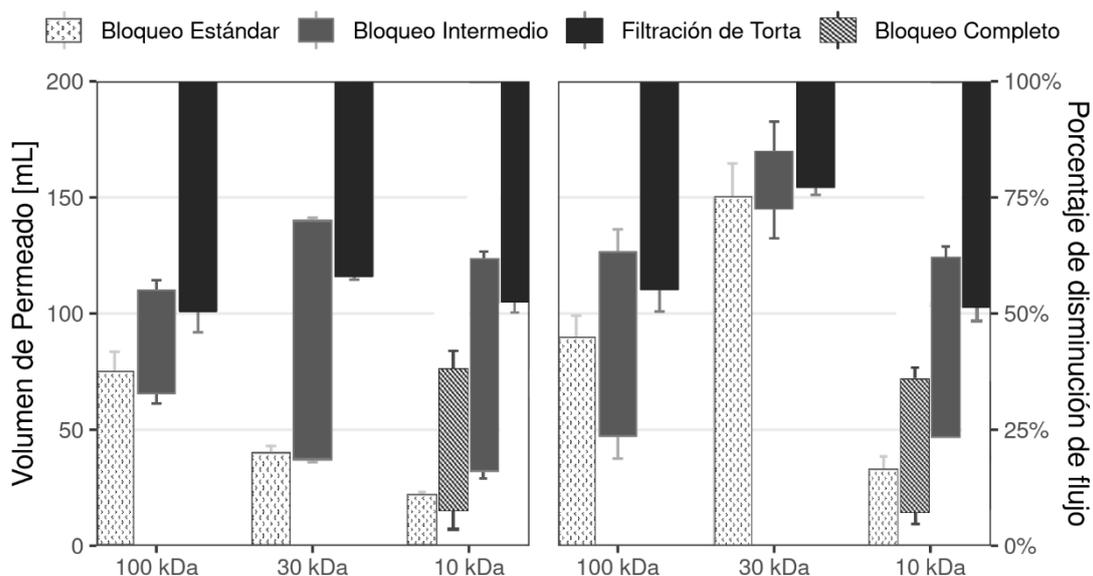
A partir de la porosidad y siguiendo la ecuación (8) se determinó la relación que existe entre la masa y el grosor en el momento de la formación de la torta. En la figura 10 es posible observar esta estrecha relación ya que, la masa de las partículas que están siendo depositadas en la superficie de la membrana es proporcional al grosor del depósito. Teniendo en cuenta esta afirmación, es posible que tanto la masa como el grosor incrementen cuando exista un mayor ingreso del flujo de alimentación hacia el sistema de filtración y por ende aumente el volumen de permeado y la cantidad de partículas adheridas a la membrana. Sin embargo, se observa que la membrana de 30 kDa posee los valores más altos de masa y grosor, es decir, abarca mayor cantidad de masa de la torta en comparación de las demás membranas (CPM: 10 y 100 kDa) a pesar de presentar el flujo de permeado más bajo (Figura 5). Aplicando las ecuaciones mencionadas en el marco metodológico y tomando la pendiente de cada uno se obtuvo la figura 10 en donde, es posible observar la tercera dimensión de la estructura fractal de la torta en formación en los tres diferentes CPM de las membranas.



**Figura 10.** Cálculo de la dimensión fractal a partir de la relación de masa y grosor de la torta para membranas con diferente CPM. En todas las condiciones, la torta alcanzó una estructura tridimensional.

### 3.4.3 Mecanismos de bloqueo durante la formación del *fouling* total en membranas de ultrafiltración

En esta investigación se realizó el análisis de dos modelos de mecanismo de bloqueo de poro tanto para materia coloidal como para polímeros, los mismos que se encuentran directamente relacionados con los contaminantes orgánicos, inorgánicos y biológicos. Los resultados de la aplicación de ambos modelos ayudan a la predicción acerca de la formación del *fouling* en la superficie de membrana. Las figuras 11 y 12 muestran el proceso que siguen los mecanismos de poro en el desarrollo del *fouling* dependiendo del tiempo de filtración y las membranas utilizadas (CPM: 100, 30 y 10 kDa) ya sea, para materia coloidal o polimérica. Además, en cada etapa de filtración existe un mecanismo de bloqueo de poro que se encuentra dominando el proceso de desarrollo de *fouling*. Sin embargo, dicho proceso ocurre simultáneamente en la fase de transición de un mecanismo de bloqueo a otro resultando en una superposición de los mismos, en donde, la disminución del flujo de permeado es proporcional.

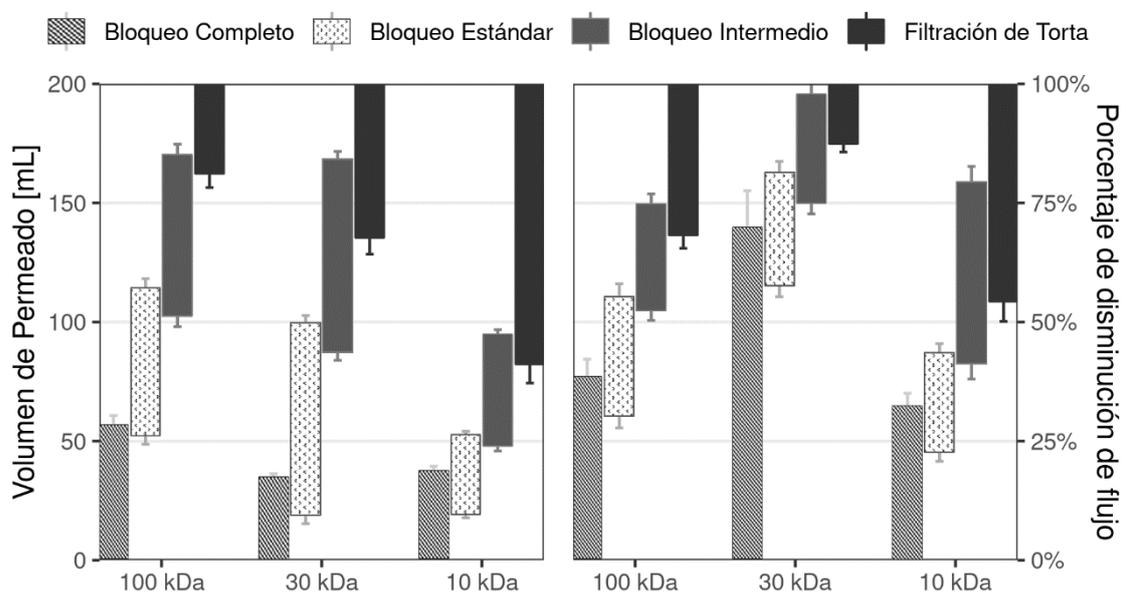


**Figura 11.** Distribución y contribución de los mecanismos de bloqueo de poro para coloides. Valores en términos de (a) volumen de permeado y (b) porcentaje de disminución de flujo.

Ambos modelos, presentaron comportamientos totalmente diferentes con respecto a la secuencia en la que se suscitaron los mecanismos de bloqueo de poro en la formación del *fouling* debido a la composición de la fuente de alimentación del sistema que, en este caso, es considerado de alta carga de materia contaminante. Con respecto, a la figura 11 esta indica la ausencia del mecanismo de bloqueo de poro completo en las membranas de 100 y 30 kDa para el modelo de coloides. Mientras que, el modelo de polímeros (Figura 12) muestra la presencia de los 4 mecanismos de bloqueo de poro en el orden propuesto en la tabla 2. Además, otra de las diferencias observadas es la cantidad de volumen y disminución del flujo de permeado que fue significativo en la etapa inicial de las membranas de 100 y 30 kDa para ambos modelos. De acuerdo con los parámetros de filtrabilidad obtenidos previamente, el modelo de polímeros (Figura 12) se ajusta mejor a estos parámetros. Sin embargo, no se descarta el modelo de coloides para este análisis (Figura 11) debido a que las partículas coloidales juegan un rol significativo y fundamental en el desarrollo del *biofouling*.

Por otra parte, cada modelo describió comportamientos diferentes en los mecanismos de bloqueo de poro para cada membrana. En donde, predominó el bloqueo estándar para el modelo de coloides con un porcentaje de pérdida de flujo mayor al 50% en la membrana de 30 kDa. Mientras, que el modelo de polímeros se evidencia la

presencia del bloqueo completo en todas las membranas con un alto porcentaje de disminución de flujo (>50%) para la membrana de 30 kDa.



**Figura 12.** Distribución y contribución de los mecanismos de bloqueo de poro para polímeros. Valores en términos de (a) volumen de permeado y (b) porcentaje de disminución de flujo.

### 3.5 Estimación de contaminantes fisicoquímicos, microbianos y virales asociados al *biofouling* en la membrana

#### 3.5.1 Depósito de contaminantes fisicoquímicos que contribuyen al desarrollo de *biofouling* de la membrana

Las muestras de agua pertenecientes al punto C2 después de ser sometidas al sistema de UF se determinaron las concentraciones fisicoquímicas, las mismas que ayudaron a estimar aproximadamente la tasa de acumulación de contaminantes emergentes adheridos a la membrana (área: 0.0036 m<sup>2</sup>) por cada hora de filtración. Para esto, se analizaron únicamente aquellos parámetros que estaban relacionados con unidades de masa y por ende fue posible cuantificar sus porcentajes de remoción.

Una vez determinadas las concentraciones fisicoquímicas de las muestras de agua después de ser sometidas a un proceso de UF, se estimó de manera aproximada la tasa de acumulación de contaminantes en la membrana (área, 0.0036 m<sup>2</sup>), en miligramos por cada hora de filtración. Para este análisis se excluyeron los parámetros *in situ* y nefelométricos, debido a que no se cuantifica sus porcentajes de remoción o sus

concentraciones no se relacionan con unidades de masa. De acuerdo con la figura 9, se espera que en una hora de filtración la membrana de 30 kDa acumule mayor cantidad de masa en su superficie a diferencia de la membrana de 100 y 10 kDa. Por consiguiente, la tabla 9 indica un análisis aproximado acerca de la tasa de acumulación, es decir, cuanto aporta en masa (mg/L) cada parámetro fisicoquímico cuantificado al acopio total de partículas en la membrana (*fouling*). Aquellas membranas que presentaron mayores porcentajes de eficiencia de remoción son capaces de retener más contaminantes debido a su menor CPM. Sin embargo, la tasa de acumulación presentada depende también de la velocidad de flujo volumétrico y este de la composición de la fuente hídrica que está ingresando al sistema. Es por esto, que se evidencia que las membranas de 30 y 10 kDa al presentar mayores porcentajes de remoción debido a su menor CPM, las tasas de acumulación de contaminantes son mayores en la mismas a diferencia de la membrana de 100 kDa.

**Tabla 9.** Tasa de acumulación de contaminantes fisicoquímicos en la membrana de UF por cada hora filtración.

Parámetros	UF-100 kDa	UF-30 kDa	UF-10 kDa
<b>Tasa de acumulación de contaminantes (mg h<sup>-1</sup>)</b>			
<b>Nutrientes</b>			
<b>Nitritos</b>	0.01 ± 0.002	0.47 ± 0.017	0.071 ± 0.058
<b>Nitratos</b>	0.32 ± 0.32	51.16 ± 0.43	5.51 ± 0.22
<b>Amoniaco</b>	0.78 ± 0.08	41.65 ± 0.07	10.18 ± 0.09
<b>Fosfatos</b>	0.49 ± 0.31	33.21 ± 0.07	7.72 ± 0.08
<b>Metales y Dureza</b>			
<b>Hierro</b>	0.42 ± 0.41	20.44 ± 0.08	4.97 ± 0.11
<b>Manganeso</b>	0.046 ± 0.008	3.07 ± 0.008	0.62 ± 0.005
<b>Dureza Ca</b>	1805 ± 0.86	110 ± 0.84	26.53 ± 1.25
<b>Dureza Mg</b>	0.92 ± 1.53	116 ± 1.02	22.5 ± 0.64

### 3.5.2 Concentración de ADN ambiental en la composición del *biofouling*

De acuerdo, con la tabla 10 esta indica la concentración de ADN ambiental acumulado en las membranas de UF (CPM: 100, 30 y 10 kDa) en una hora de filtración de agua superficial del punto C2. Esta actividad se realizó por triplicado, sin embargo, para este análisis se tomó los datos que obtuvieron una mayor concentración y se encontraron entre los rangos óptimos de pureza e integridad (1,8 y 2,0). En todas las extracciones y cuantificaciones fue posible determinar que en la membrana de 30 kDa existió una mayor concentración de ADN, atribuyendo de esta forma a lo anterior mencionado ya que, esta membrana abarcó mayor cantidad de masa. Una vez cuantificado la concentración de ADN adherido en la superficie de la membrana, se estimó la cantidad de biomasa y células bacterianas equivalente a la concentración de ADN extraído (Tabla 10). Esta aproximación de cantidades de biomasa microbiana y número de células bacterianas presentes en el sistema fluvial resulta factible emplearlo debido a que, el sitio de estudio se encuentra directamente influenciado por la actividad microbiana; las mismas que aportan significativamente a la formación del *biofouling*.

**Tabla 10.** Concentraciones de ADN ambiental extraído a partir de membranas con diferente CPM como parte de la composición del *biofouling*.

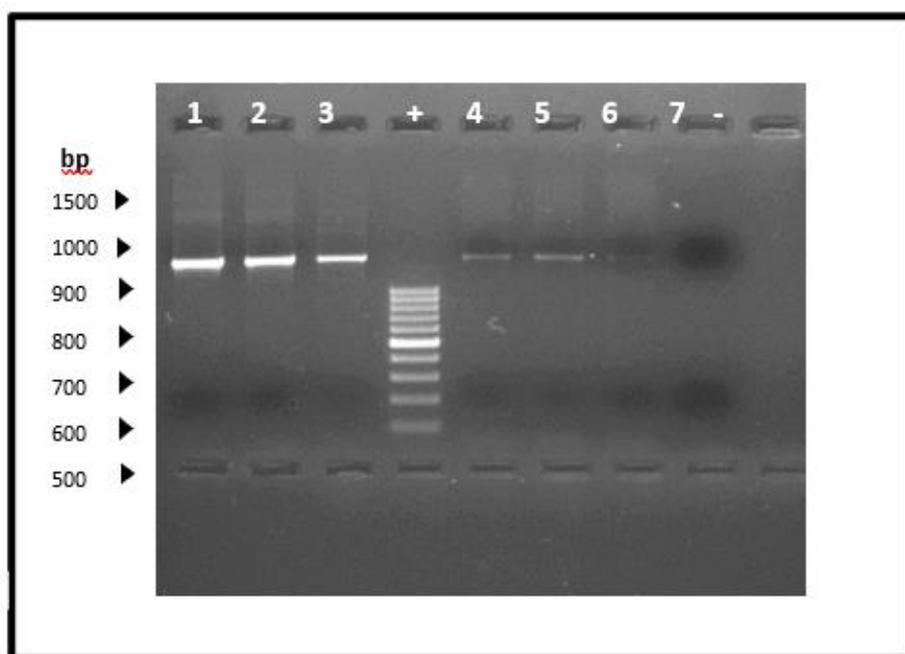
Muestra	Cuantificación ADN			Biomasa-microbiana <sup>a</sup> ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	Número de células bacterianas <sup>b</sup> ( $\text{células}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	Tasa de acumulación biomasa ( $\text{mg}\cdot\text{h}^{-1}$ )
	Concentración ( $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ )	Abs 260/280	Abs 260/230			
100 kDa	155.1	1.88	1.66	71.52	$1.1 \times 10^9$	5.14
30 kDa	310.3	1.83	1.67	143.08	$4.9 \times 10^9$	10.3
10 kDa	236.8	1.78	1.90	<u>109.19</u>	$3.7 \times 10^9$	7.86

<sup>a</sup> Estimación basada en la correlación ADN / biomasa descrita por Flemming et al. [35].

<sup>b</sup> Se consideró la masa bacteriana unitaria establecida por Neidhart et al. [16].

### 3.6 Detección de ADN bacteriano presente en la composición del *biofouling* depositado en la membrana

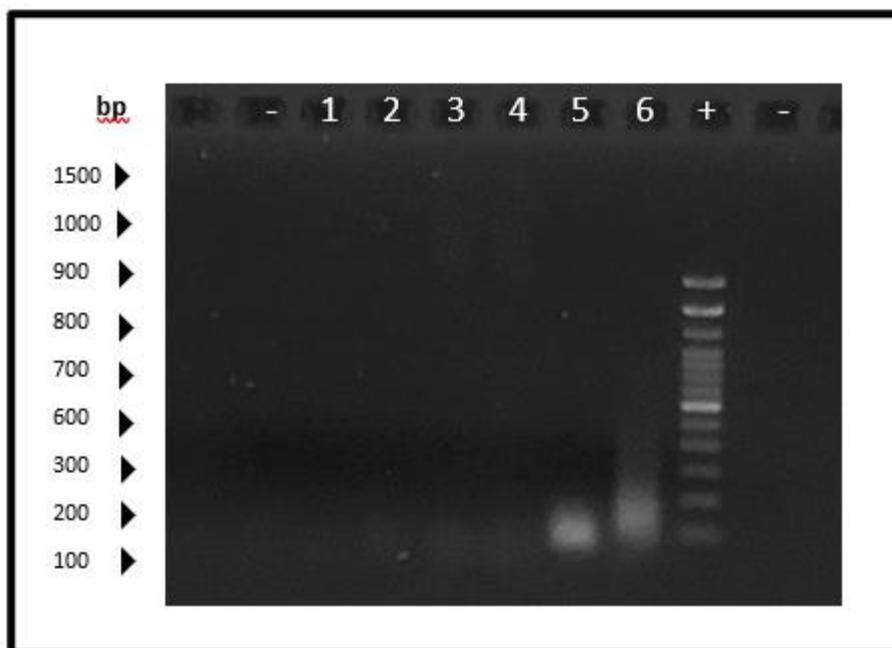
Con los resultados obtenidos en la tabla 10 acerca de la cuantificación bacteriana se puede observar concentraciones de ADNg bacteriano ambiental depositado en la superficie de la membrana. Sin embargo, para confirmar estos resultados se realizó una corrida electroforética (Anexo 4) la cual se correlaciona directamente con la cuantificación. Después de realizar los respectivos corridos electroforéticos de los productos obtenidos de PCR empleando el primer 27f, y 1492r se obtuvieron 5 de 6 resultados positivos para la amplificación del gen 16S. En donde, 3 de estos, es decir, el 50% de los resultados fueron bandas de alta calidad con 950pb, mientras que en la segunda repetición únicamente se visualizaron bandas tenues con baja intensidad en lo que respecta a las membranas de 10 y 30 kDa (Figura 13), refiriendo de esta manera la presencia de microorganismos bacterianos en las membranas contribuyendo a la formación del *biofouling*.



**Figura 13.** Amplificación por PCR convencional (cebadores 27f) de ADNbc a partir de seis membranas de PES (CPM: 100, 30 y 10 kDa), visualizados en electroforesis en gel de agarosa al 1% en TBE. Carriles 1 y 4, membrana de 30 kDa. Carriles 2 y 5, membrana de 10 kDa. Carriles 3 y 6, 100 kDa.

### 3.6.1 Detección de virus entéricos presentes en la composición del *biofouling* depositado en la membrana

La suspensión vírica concentrada en la superficie de las membranas dependió del sitio de muestreo, profundidad y estación del año. El foco de estudio de esta investigación fue un sistema hídrico con una alta cantidad de materia orgánica debido, a la presencia de una constante descarga de aguas servidas. Es por esta razón, que los enterovirus sirven como indicadores víricos ya que, son resistentes a los procesos de tratamiento de desinfección del agua. La figura 14, indica la presencia de virus de origen humano específicamente adenovirus debido a que, el cebador empleado hibrida un sitio altamente conservado dentro de la región 5' del genoma del adenovirus. Además, los adenovirus son encontrados en grandes cantidades en aguas residuales a diferencia de otros serotipos de enterovirus. Al aplicar el método de PCR convencional fue posible observar bandas de amplificación positivas entre 140 bp – 160 bp únicamente en los carriles 5 y 6 pertenecientes a las membranas de 30 y 10 kDa respectivamente. Mientras, que en los carriles 1 -4 resultó negativo las amplificaciones atribuyendo a varias razones como son el tamaño de la membrana, dsADN degradado o inhibidores presentes en los reactivos.



**Figura 14.** Amplificación por PCR convencional (cebadores AQ1 y AQ2) de dsADN a partir de seis membranas de PES (CPM: 100, 30 y 10 kDa), visualizados en electroforesis en gel de agarosa al 1% en TBE. Carriles 1 y 4, membrana de 100 kDa. Carriles 2 y 5, membrana de 30 kDa. Carriles 3 y 6, 10 kDa.

## CAPÍTULO IV: INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN

### 4.1 Caracterización de parámetros fisicoquímicos y microbiológicos de agua superficial

Los valores reportados en la tabla 3 acerca de las variables fisicoquímicas medidas en la zona C1- C2 del sistema fluvial urbano Tena reflejan que la naturaleza química, física y biológica del agua sobrepasa los LMP evidenciando una salud deficiente del río. Con respecto, a los parámetros nefelométricos medidos in situ como el pH se observó un comportamiento ligeramente alcalino  $>7$  antes y después del tratamiento de UF. El pH resulta ser un parámetro de gran influencia en la estructura química de los sistemas acuáticos y en la actividad vital de los microorganismos. De acuerdo con Wang y Tarabara, 2008 [21] cuando se presenta en el sistema un pH alcalino indica la eliminación constante de oxígeno debido a la presencia de iones carbonato-bicarbonato ( $CO_3^{2-}$  y  $HCO_3^-$ ). El agua de tipo residual urbano-industrial se caracteriza por contener grandes cantidades de sodio y bajas concentraciones de calcio y magnesio, es por esto que el pH de la zona C2 tiende a la alcalinidad. Por otro lado, se observa en la tabla 3, que el río al estar en contacto con aguas residuales este presenta altas cantidades de color y turbidez debido a la presencia de sustancias húmicas y ácidos fúlvicos los mismos, que al estar en contacto con los procesos de desinfección de las PTAR sufren cambios químicos que perjudican a la salud del río. Además, Jetten et. al, 2007 [37] menciona que los valores altos de turbidez podrían ser provocados por la existencia de intensas precipitaciones en terrenos de fácil erosión, aumentando el nivel de sólidos y este provocando un rápido efecto en la turbidez y color del agua. Sin embargo, la fuente de alimentación del sistema de UF se considera como una zona con alta carga de contaminación biológica patógena, por lo que este parámetro está asociado con la presencia de bacterias y virus. La presencia de estos compuestos nitrogenados es de vital importancia dentro del

ecosistema acuático ya que, forma parte de la cadena alimenticia estimulando el crecimiento del fitoplancton, sin embargo, un exceso de los mismos ocasiona severos daños en el sistema fluvial [38]. El nitrógeno presente en sus tres formas (nitrato, nitrito y amonio) en la zona urbana del río Tena presentó valores que bordean LMP a excepción de los nitratos los cuáles excedieron el límite permisible. Generalmente, en el exceso de nitratos en los sistemas hídricos naturales se deriva principalmente de los depósitos de estiércol de ganado, aguas servidas y fertilizantes químicos donde, se practica una agricultura intensiva [39]. Por otra parte, el amonio a pesar de bordear los LMP se encuentra en una cantidad significativa (Tabla 3) debido al vertido de las aguas residuales, las cuáles contienen una fuente importante de excrementos y orina convirtiéndose en el 50% de la fuente nitrógeno orgánico el mismo, que se convertirá rápidamente en nitrógeno amoniacal [40]. De acuerdo con Cárdenas et. al, 2013 [40], el amoniaco está relacionado directamente con el ion amonio por lo que, altas cantidades del mismo indicaría un pH alcalino como se muestra en los resultados obtenidos.

Con respecto a las cantidades de fosfatos estos resultaron estar presentes en altas cantidades a pesar de estar dentro del rango permitido por la normativa INEN y TULSMA. Principalmente, sus altos valores se deben a las aportaciones de las aguas residuales como producto del uso de detergentes o como heces y orina humanas ya que, estas están compuestas por 3,0% y el 5,0% respectivamente por fósforo en forma de  $P_2O_5$ . De acuerdo con Sardiñas, 2004 y Ávila, 2007 [41,42] el fosfato con valores elevados se da debido a la actividad bacteriana y de protozoarios, ya que estos son capaces metabolizar y excretar nutrientes minerales principalmente fosfato y amonio. Es por esta razón que la probabilidad del incremento de estos dos parámetros se deba al producto metabólico de estos microorganismos. Así mismo, la producción agrícola y acuícola realizada en la ciudad de Tena y, además, el grado de intervención humana que existe en las zonas urbanas aledañas al sitio de estudio, contribuyen en el aumento de las concentraciones de estos nutrientes que conllevan al deterioro del sistema acuático dulce. Así también, se cuantificó la dureza del agua midiendo los minerales de calcio y magnesio disueltos presentes en el sistema fluvial, los mismos que presentaron valores bajos. Esto se debe a las altas precipitaciones de los bicarbonatos presentes en el agua elevando el pH y tendiendo a la alcalinidad [43] teniendo en cuenta lo anterior

mencionado se considera este sitio de muestreo como un agua medianamente dura que requiere de un proceso que garantice su correcta desinfección. De acuerdo con varios estudios realizados se ha evidenciado que el constante vertido de agua residual afectan a la estructura y función de las comunidades microbianas nativas de los sistemas fluviales. Haciendo referencia a los resultados obtenidos de cada uno de los parámetros microbianos medidos es posible corroborar la presencia de bacterias indicando positividad en cada una de las muestras tomadas. Las descargas de aguas servidas causan efectos negativos en los ecosistemas dulces incrementando la concentración de nutrientes y con ello el incremento de las concentraciones de coliformes totales, termotolerantes y de la especie *Escherichia coli* [44]; razón por la cual, el análisis de la calidad de agua de estos ecosistemas constituye una necesidad urgente, para garantizar la salud de la población que se sirve de las aguas fluviales del río Tena para abastecer diferentes actividades. Los valores de los análisis microbiológicos para Bacterias Mesófilas Aeróbicas (BMA) y para coliformes totales (CT) fueron elevados incluso superiores a los límites permitidos (Tabla 4, Figura 3) en lo que respecta al punto C2, indicando contaminación por desechos fecales y el vertido directo de aguas residuales. Es importante recalcar que las concentraciones bacterianas más altas aparecen en la zona baja de la ciudad de Tena después de la desembocadura de la PTAR, la cual transporta una alta carga microbiana debido a la descarga continua de aguas residuales. Chávez et. al, 2016 [45] menciona que, usualmente los tramos de los ríos se utilizan como aguas receptoras de efluentes de las PTAR, esta descarga directa de las mismas y la contaminación difusa hace que la calidad microbiana del agua del río se vea gravemente afectada. Por ejemplo, en el estudio realizado por [46] se reportó que aquellos efluentes residuales con altas cantidades de amoníaco provocaban un mayor desarrollo de bacterias oxidadoras de amonio, asegurando de esta manera una completa nitrificación en las zonas debajo de las descargas. Por otro lado, las concentraciones de nitrato en aguas superficiales fueron altas, el exceso de este compuesto puede causar la formación endógena de N-nitrosocompuestos, de efectos cancerígenos, como son las nitrosaminas, así como, afectar significativamente en el metabolismo de las comunidades microbianas autóctonas del río [47].

La calidad sanitaria del agua cruda evaluada a pesar de encontrarse bajo los LMP se caracterizó por ser deficiente, debido a la presencia de bacterias coliformes, y posibles microorganismos patógenos encontrados en diferentes puntos del río Tena los mismos que fueron descritos en trabajos anteriores realizados por el equipo de investigación *Hi-Water*. Como se mencionó anteriormente, la contaminación por coliformes fecales (CF) se debe a los efluentes de agua residual (AR) con carga de heces y orina esto, coincide con lo propuesto por diversos autores [48], que surgieron que las aguas que reciben ingresos de efluentes cloacales muestran una relación directa entre coliformes fecales y coliformes totales. De forma similar, el sitio de muestreo reportó elevadas concentraciones de BMA, debido que los ríos urbanos se encuentran dominados por Proteobacterias gracias a las constantes descargas residuales. Así mismo, los análisis realizados con anterioridad por el equipo de investigación *Hi-water* identificaron un número menor de colonias bacterianas gramnegativas y enterobacterias en zonas arriba a la desembocadura de las AR en el río Tena. Sin embargo, el punto de muestreo C2 reveló una gran cantidad de este tipo de microorganismos debido a la ubicación urbano-industrial de la zona en foco de estudio, además, de que no existe una distancia considerable entre la desembocadura de la PTAR y el río receptor.

De acuerdo a la zona estudiada y a su ubicación geográfica los resultados muestran que los aportes de las aguas residuales tratadas deficientemente perjudican significativamente la salud del río. De acuerdo al análisis de similitud realizado en un estudio previo acerca de la carga de contaminación presente en tres grupos diferentes de muestreo a lo largo del río Tena (Anexo 1). Estos análisis permitieron considerar a los puntos de muestreo A2 y B2 como una zona de baja y media carga de contaminación respectivamente en comparación al punto C. En el anexo 2, claramente se observa que la concentración de amonio, nitratos, fosfatos y hierro fueron dominantes en la zona C ya que, sobrepasaron los LMP establecidos en el TULSMA. Es por esto también, que las altas cargas de nutrientes encontrados en el sitio de estudio (Punto de muestreo C) la distribución de las comunidades microbianas patógenas fue mayoritaria en comparación a los otros dos sitios analizados previamente (Anexo1-2). Por otra parte, al presentar mayor carga de contaminación quiere decir que existe en grandes cantidades materia orgánica en la que tanto virus (enterovirus) como bacterias

(gramnegativas) se adhieren en los sólidos presentes en aguas residuales y naturales [49].

Las diferencias en la eficiencia de remoción de contaminantes emergentes y microorganismos patógenos observadas para todos los CPM de las membranas de UF indican claramente que el tamaño de poro y la capa de ensuciamiento formada de cada una son diferentes. La tabla 5 indica que las membranas de 30 y 10 kDa lograron reducir las concentraciones de los contaminantes de una manera eficiente, haciendo que cada uno de los parámetros físicoquímicos y microbiológicos se encuentren dentro de LMP. Sin embargo, la membrana de 100 kDa fue aquella que presentó una inadecuada o deficiente remoción, dicho comportamiento se ve relacionado con tamaño de poro de las membranas utilizadas ya que, en los CPM menores tanto microorganismos como materia orgánica-inorgánica se quedaron retenidos en la superficie por efecto de la filtración reduciendo de esta forma las concentraciones de los contaminantes [50]. Por ejemplo, se ha reportado en estudios anteriores que las membranas con poros más grandes mostraron un mayor flujo de permeado y menos ensuciamiento en la membrana que aquellas de un tamaño de poro menor [50]. Con respecto a contaminantes de carácter importante para la salud del río y la población como nitratos, fosfatos y hierro las membranas de 30 y 10 kDa aseguran una desafección óptima mayor a un 80% mientras, que la membrana de 100 kDa alcanza como un máximo de desinfección del 50%. Sin embargo, en lo que respecta a coliformes totales ninguna de las tres membranas logró una remoción adecuada. Finalmente, en estudios previos realizados en dos diferentes puntos de muestreo (A2-B2) en el río Tena se observó una mayor remoción de contaminantes empleando las tres membranas, debido a que fueron consideradas como zonas de baja y media carga (Anexo 1-2).

#### **4.2 Eficiencia del sistema de ultrafiltración en la potabilización de agua superficial**

Cada uno de los parámetros de filtrabilidad y las resistencias de las membranas (Tabla 8) fueron cuantificados en base a datos experimentales y a las ecuaciones mencionadas en la metodología. Al determinar cada uno de estos parámetros fue posible identificar la eficiencia de la permeabilidad de la membrana en base al desarrollo de la torta y como

esto interfirió en los mecanismos de bloqueo. Con el propósito de diferenciar la capacidad de producir agua potable en cada una de las membranas se evaluaron los parámetros de mayor importancia como son las resistencias de membrana y de la torta, tipos y secuencias de los mecanismos de bloqueo suscitados y el comportamiento del flujo de permeado. La membrana de 100 kDa fue aquella que presentó mayor resistencia en comparación de las de 30 y 10 kDa (Tabla 9), provocando mayores efectos en los parámetros de filtrabilidad, flujo de permeado incluso en la permeabilidad intrínseca de la membrana. Con respecto a la membrana de 100 kDa presentó un flujo inicial menor (150,3 L/m<sup>2</sup>h) debido a los altos valores de resistencia de la membrana (Tabla 9). De acuerdo al estudio realizado por Wang et. al, [21], al presentar mayor resistencia de membrana el flujo de permeado debe ser menor, sin embargo, la membrana de 100 kDa mostró un comportamiento distinto (Tabla 8, Figura 4), en donde se observa mayor resistencia y mayor flujo de permeado respectivamente. Dicho comportamiento puede deberse a la capa de *biofouling* que se forma al momento de la filtración ya que, la fuente de alimentación se caracteriza por contener altas cargas de materia orgánica-inorgánica y biológica [53]. Además, al emplear la membrana de 100 kDa en el proceso de filtración se evidencia un mayor volumen de flujo inicial debido a su mayor tamaño de poro, sin embargo, al trabajar con una muestra altamente contaminada esta ensucia rápidamente la superficie de la membrana obstruyendo el paso continuo del flujo. Así también, se observó que mientras aumentaba el tiempo de filtración el flujo de permeado disminuía rápidamente hasta alcanzar un flujo sostenible, siendo la membrana de 100 kDa la que alcanzó más rápido el estado estacionario del flujo (Figura 4, Tabla 9). Este fenómeno está estrechamente relacionado con el comportamiento del flujo normalizado que se observa en la figura 5a y el inicio del flujo sostenible el mismo, que coincide con la filtración de torta la cual se observa que inicia antes de llegar a los 100 mL de volumen de permeado. Esto es posible observar en la figura 5b cuando el comportamiento de la gráfica tienda a linealidad con una pendiente positiva indicando el inicio del flujo sostenible hasta que este llegue a ser constante; teniendo a las membranas de 100 y 10 kDa como las primeras en buscar el estado estacionario del flujo. Por otro lado, la formación de la torta esta precedida por diferentes mecanismos de bloqueo de poro los cuáles, se presentan en las etapas iniciales de los experimentos de filtración. Wang et. al, [21] mostró una tendencia similar

entre a filtración de torta y el flujo sostenible, pero en el presente estudio la resistencia específica de la torta fue una variable clave (Figura 6) que estuvo también relacionada con los dos parámetros mencionados anteriormente (Figura 4, Figura 5). Con respecto a la permeabilidad intrínseca (Figura 7) se observa un comportamiento similar al flujo de permeado (Figura 4) en donde, la membrana de 100 kDa presenta valores mayores de flujo de permeado a pesar, de poseer una resistencia más alta que las membranas de 30 y 10 kDa, acoplándose a lo descrito anteriormente. De acuerdo con Qu et al., [56] el comportamiento de la membrana de 100 kDa puede explicarse por tres posibles razones según lo reportado en el estudio. Una de las razones es la hidrofobicidad que poseen las membranas de PES en donde, la materia orgánica extracelular secretada por los microorganismos presentes en el agua analizada produce mayor cantidad de *fouling* haciendo que exista un menor flujo de permeado en las etapas iniciales de la filtración para después reducir el mismo significativamente. Además, se describe que las membranas que poseen poros más grandes suelen ser más vulnerables al bloqueo de poro por la electrostática de las cargas más no, por la adsorción de materia en la superficie como sucede en las membranas de poro más pequeño (30 y 10 kDa). Finalmente, la tercera interpretación está relacionada con las características de la primera capa de la torta en formación durante el proceso de UF. Debido a que al aumentar el tamaño de los poros el flujo de la membrana aumenta, sin embargo, si el *biofouling* de la torta se compacta para ser menos porosa y existe un arrastre de permeado más fuerte se produce un flujo sinuoso lo que aporta volumen al flujo de permeado así sea en bajas cantidades. Así mismo, en el estudio descrito por Marshall et. al y Qu et. al, [53,54] menciona que existe una mayor resistencia a la torta cuando se utilizan membranas de 100 kDa del material de PES. Entonces, cuando la resistencia de la membrana es mayor que la de la torta, la acumulación de la materia taponante juega un rol importante en la reducción del flujo. Por lo tanto, en el presente trabajo la membrana de 100 kDa, que tenía una mayor resistencia de la membrana y mayor resistencia a la torta tuvo como resultado una mayor cantidad de flujo de permeado durante la UF.

En relación a cada mecanismo de bloqueo de poro ambos modelos presentaron diferencias ya que, para coloides únicamente la membrana de 10 kDa presentó bloqueo

completo mientras que para el modelo polimérico todas las membranas presentaron todos los mecanismos en la secuencia adecuada (Tabla 2). En lo que respecta al modelo para coloides, las membranas de 100 y 30 kDa mostraron bloqueo estándar como el inicial, seguidamente se produjo el bloqueo intermedio y como era de esperarse finalmente la filtración de torta (Figura 11 y 12). La membrana de 10 kDa presentó dicho comportamiento debido al menor tamaño de poro y porosidad de la superficie de la misma, en comparación al CPM de las otras membranas. Shen et. al, [55] describió en su estudio que el bloqueo completo se caracteriza por ser el mecanismo principal de ensuciamiento causado por la propiedad hidrofílica que poseen los productos microbianos excretados. Debido a la naturaleza y al diminuto tamaño de las partículas presentes en la muestra de agua superficial, el bloqueo estándar fue el primero en suscitarse al inicio de la filtración para las membranas de 100 y 30 kDa siguiendo el modelo de coloides. Como era de esperarse, Flemming et. al, [29] mencionan que la primera capa de torta en la superficie de la membrana puede atrapar algunas moléculas de bajo peso molecular y mejorar la eliminación de sustancias orgánicas durante la filtración por membrana. Por otro lado, en lo que respecta a polímeros este presentó todos los mecanismos de bloqueo en los tres tipos de membrana. De acuerdo con Qu et al., [54] cuando se trata de sustancias similares a las proteínas y a los polisacáridos presentan mayor adherencia a la superficie de la membrana ya que, la hidrofobicidad de las membranas de PES ayuda a una retención mayor de estas sustancias poliméricas. El análisis de los datos empleando las ecuaciones matemáticas de ambos modelos indica que el bloqueo estándar dominaba el proceso de filtración en lo que respecta a coloides, mientras que para polímeros fue el bloqueo completo quien tuvo mayor dominancia, ambos con una pérdida de flujo de casi el 75%. De acuerdo con Bowen et. al, [56] esta secuencia de mecanismos de bloqueo depende de la morfología de los poros, es decir, su tamaño y la distribución de los mismos, además, de las características de las partículas del fouling depositado en la membrana. Así también, la presencia de los contaminantes emergentes como iones o sales inorgánicas cuantificados en este estudio (nitratos, amoníaco, fosfatos etc.) contribuyen significativamente en el bloqueo de poro y por ende en la tasa de pérdida de flujo, mostrando mayor porcentaje de disminución de flujo en las tres membranas diferentes. Además, para tiempos de filtración más largos, existió una transición del mecanismo de bloqueo intermedio hacia la formación de torta. Esta

transición ocurrida en las etapas finales indica que la MON coloidal penetra más fácil en los poros de las membranas de CPM mayor (100 kDa) influyendo así en la velocidad de bloqueo de los poros [56]. Costa et. al [57] también sugiere que la estructura de la capa de biofouling formado depende de la presión de funcionamiento del proceso de UF y, por tanto, afecta significativamente en el grado de disminución de flujo. Finalmente, en estudios previos se ha reportado que la MON influye en el comportamiento bacteriano produciendo MOE de propiedad hidrofóbica, por lo que, va a adherirse fácilmente a la membrana y de esta manera potenciará la formación de *biofouling* [58].

#### **4.3 Formación de *biofouling* durante el proceso de ultrafiltración de agua superficial del río Tena**

Cada uno de los parámetros de filtrabilidad se ajustan a los modelos propuestos, indica que toda la superficie de membrana se encuentra cubierta por una primera capa de partículas que promoverán el desarrollo del *biofouling*. De acuerdo con Cerón y Noyola [58], la estructura inicial de la torta cuando se encuentra en una presión cero la filtración depende principalmente del tamaño, forma y estado de agregación de las partículas (polímeros y coloides). Los procesos de ultrafiltración pueden ser dominados por la concentración de materia orgánica, inorgánica y biológica presente en el agua de alimentación debido a la formación de torta [59]. Estudios previos han descrito que la materia orgánica presente en el efluente se caracteriza por contener grandes fracciones de productos microbianos y virales solubles, los mismos que han sido producidos durante el tratamiento de aguas residuales [60]. Para sistemas que trabajan con membrana, las sustancias poliméricas extracelulares (SPE) y las células bacterianas son considerados un componente importante en la incrustación de partículas en la superficie de la membrana [61]. Debido a que, estas SPE y los productos microbianos suelen acumularse en el interior de los poros (bloqueo completo e intermedio) contribuyen a la acumulación de la biomasa (Tabla 10) y permite la formación de la torta. De acuerdo con Herrera-Robleto et. al, [62, 63], la distribución de la biomasa por el área de los poros de la membrana, hace que exista un esparcimiento irregular del ensuciamiento, creando así una acumulación sólida de partículas similar a los conglomerados. Así mismo, mencionan que este tipo de acumulación de la materia

podría servir como nichos para el desarrollo de microorganismos que al encontrarse en una fase de supervivencia, son capaces de secretar en altas cantidades SPE. De acuerdo, con los resultados obtenidos en secciones anteriores, la formación del *biofouling* viene dada por cinco etapas.

La etapa inicial es la limitación de la membrana en la formación del *biofouling*, en la cual, una vez que el agua de alimentación entra en contacto con la membrana, la superficie de esta se rodea de una nube de cargas eléctricas, las cuales por atracciones electroestáticas provocan un bajo rendimiento en el flujo de permeado (Figura 5). Dicho comportamiento se debe a las características propias de la fuente de alimentación, ya que, contiene grandes cantidades de sólidos y microorganismos, a diferencia de los estudios realizados con anterioridad en zonas menos contaminadas. Seguidamente, la segunda etapa, está dada por la restricción del área de filtración, debido a los diferentes mecanismos de bloqueo de poro, ambas etapas al ser parte de la fase inicial ocurren de manera simultánea. De acuerdo, a la naturaleza de la corriente de alimentación el depósito y acumulación de las partículas en la superficie (bloqueo intermedio) y en el interior (bloqueo estándar) afecta de igual manera al flujo de permeado, contribuyendo significativamente en la disminución del mismo. Los componentes causantes de estos fenómenos pueden ser coloides o polímeros. Sin embargo, de acuerdo a los resultados obtenidos y a los modelos matemáticos aplicados al tipo de agua superficial del punto C del río Tena, se caracteriza por contener mayor concentración de sustancias poliméricas. Además, para este estudio se utilizaron membranas con tres diferentes CPM, en donde, las membranas de 30 y 10 kDa fueron capaces de separar de manera más eficiente todos los sólidos, coloides, polímeros y microorganismos (virus y bacterias). Finalmente, para la culminación de la etapa inicial se encuentra la tercera fase, la misma, que hace referente a la colonización aleatoria de las partículas en la superficie de la membrana. En donde, la acumulación de la materia al interior de los poros ocasiona el bloqueo estándar, mientras que el taponamiento de los mismos provoca el bloqueo intermedio; incrementando de esta manera el flujo local a través de cada poro de la membrana y por ende el acopio de los sólidos en la superficie [64]. Por ejemplo, la corriente de alimentación que fue analizada en este estudio, se caracteriza por poseer una

composición heterogénea lo cual, favorece a la colonización estocástica y al desarrollo de SPE lo que, a su vez, permite una mejor adhesión microbiana hacia la superficie de la membrana.

#### **4.3.1 Desarrollo de *biofouling* bacteriano en la potabilización de agua superficial del río Tena.**

Continuando con las etapas de formación del *biofouling* para este nivel, es posible obtener una bicapa que funcionará como un prefiltro entre la materia biótica (virus y bacterias) y abiótica (sólidos, sales, nutrientes, MON, etc.) para después, continuar con la formación de la torta. A medida que el proceso de filtración avanza, el prefiltro formado se consolida debido a las interacciones que existen entre los microorganismos, SPE y la materia orgánica-inorgánica existente en la corriente de alimentación. Houari et. al, [63,64], menciona que los sólidos y la materia híbrida presente en el agua superficial durante la filtración promueven una solidificación entre las SPE secretados por los microorganismos y las partículas (sólidos) en la superficie de la membrana. Estudios realizados acerca de la estructura de la matriz del biofilm ha evidenciado que presenta canales, por los cuales, permite el flujo de agua, nutrientes y oxígeno permitiendo la existencia y supervivencia de ciertos microorganismos [65]. En estudios realizados con anterioridad sobre una zona prístina del río Tena se observó bajas cantidades de biomasa bacteriana, sin embargo, esta investigación presentó altas concentraciones de biomasa (Tabla 10) y número de UFC (Tabla 4, Figura 3) presentes en aguas con alta carga de contaminantes, contribuyendo de esta forma significativamente la formación de la torta. Las biopelículas bacterianas, se encuentran presentes en los sistemas de tratamiento de aguas residuales albergando microorganismos patógenos, es por esta razón que la zona foco de estudio (Punto C2) al recibir continuamente un efluente de aguas residuales se espera que contenga grandes cantidades de especies bacterianas. Además, gracias a los altos valores de acumulación de biomasa que experimentaron las membranas de 30 y 10 kDa, se esperaría que la formación del *biofouling* en estas dos membranas sea densa y cubierta en su gran mayoría por SPE. Este hecho, puede verse relacionado en los trabajos de Lasa et. al, [64] y Nazar J., 2007 [65] donde mencionan, que las bacterias gramnegativas

(características de las aguas residuales) gracias a sus flagelos y fimbrias son capaces de iniciar la adherencia primaria hacia la superficie, para después formar una microcolonia en la parte superior de la membrana y empezar a secretar un exopolisacárido que será el constituyente principal de la matriz del biofilm. En este estudio es posible evidenciar que en el proceso de filtración de torta el flujo de permeado alcanza el estado estacionario sin experimentar cambios abruptos, lo cual, podría ser un claro indicador que el *biofouling* ha alcanzado su equilibrio estructural. Las figuras 8 y 9 presentan los resultados obtenidos al aplicar los modelos de acumulación de partículas, en donde es posible observar que la dimensión fractal de la torta ha alcanzado una estructura tridimensional con porosidades muy bajas; indicando que la membrana de 30 kDa fue aquella que experimentó una mayor tasa de acumulación de biomasa por cada hora de filtración (Tabla 12). Se espera que, a mayores volúmenes de filtración, se formen biopelículas con una matriz tridimensional mucho más estructurada. Sin embargo, este proceso consumirá más tiempo de filtración debido, a la cantidad de partículas y microorganismos presentes en la corriente de alimentación al ser considerada como una zona de alta carga.

#### **4.3.2 Regulación del proceso de formación del *biofouling* bacteriano**

Diversos estudios experimentales sugieren que el proceso de desarrollo del *biofouling* finalice con la etapa de la actividad de sincronización bacteriana, llamada *quorum sensing* [66,67]. Las biopelículas formadas gracias a la interacción entre las múltiples concentraciones de microorganismos y la materia presente en la corriente de alimentación analizada (Punto C2), permiten la formación de la estructura de la torta. Además, de albergar especies bacterianas que serán capaces de realizar el proceso de autoinducción o *quorum sensing*. En este estudio, al presentar una colonización bacteriana considerable adherida en la superficie de la membrana (Figura 3), las bacterias requerirán de señales químicas que les permita comunicarse entre ellas y sobrevivir. De acuerdo con Shroff y Nerenberg, 2012 [66], el proceso de *quorum-sensing* es realizado por cada bacteria que se une a una superficie sólida, en este caso la membrana de PES, para después, producir una molécula señal, de tal manera que

mientras más bacterias se unan, se incrementará la concentración local de esta señal. También, Nazar J., 2007 [65] menciona, que este sistema es considerado un mecanismo de regulación que depende de la acumulación bacteriana para enviar señales en el medio ambiente de la biopelícula formada, que permita a las bacterias apreciar la densidad de la población existente a su alrededor. Esta técnica de autoinducción, desata una cascada de reguladores la cual, inicia con la producción de señales químicas extracelulares (autoinductores), que son detectados por los receptores de las demás células bacterianas, que afectan a genes de expresión y, por ende, al comportamiento fisiológico de las comunidades microbianas presentes [65, 66, 67]. Dichos autoinductores, varían dependiendo del tipo de bacterias (grampositivas y gramnegativas) presentes en la corriente de alimentación. Los resultados determinados en este estudio (Figura 3), indican que las muestras de agua superficial pertenecientes a la zona urbana del río Tena se componen por bacterias grampositivas y en su mayoría gramnegativas debido a la presencia del efluente de la PTAR en el área de estudio. Es por esta razón, que los principales autoinductores secretados corresponderían a acilhomoserina lactona (AHL) en bacterias gramnegativas y autoinducer-2 (AI-2) en ambas bacterias [67,687]. Las colonias microbianas utilizan esta técnica para compartir señales a medida que las bacterias crecen y la población aumenta, generando una especie de sociomicrobiología para la formación de biopelículas y virulencia [69,70]. Por ejemplo, en un estudio con *P. aeruginosa* demostró que el desarrollo del biofilm está regulado por un proceso del autoinductor AHL, mientras que, para *E. coli* y *V. cholerae* se han determinado otros reguladores como CsrA y CytR respectivamente [70]. Debido al efluente de agua residual en la zona de estudio, se esperaría encontrar los mismos resultados mencionados anteriormente debido a la presencia de este tipo de bacterias. Por otro lado, se ha desarrollado un nuevo pretratamiento el cual, implica modificaciones en la expresión genética de las bacterias, con el propósito de controlar o disminuir la formación de *biofouling*. El *quorum quenching* es una técnica que está basada en el bloqueo de la síntesis de señales empleando la degradación enzimática o interfiriendo en la recepción de la señal química secretada [70]. Actualmente, este proceso no es aplicado a nivel industrial sin embargo es una técnica prometedora para solventar y mejorar las desventajas que provoca el rendimiento del sistema frente a la formación del *biofouling*.

### 4.3.3 Persistencia de virus en la formación del *biofouling* durante la ultrafiltración de agua superficial del río Tena

Una de los principales objetivos del proceso de ultrafiltración del agua superficial del río Tena es eliminar patógenos tanto microbianos como virales de una manera eficiente con el propósito de obtener agua potable y así minimizar los riesgos de salud pública. Se conoce que los virus presentes en las PTAR suelen ser muy abundantes, aproximadamente  $10^8$  a  $10^{10}$  partículas similares a virus por cada mL de agua residual [71]. Es por tal razón, que es importante determinar la influencia de las concentraciones virales en la formación de las biopelículas, ya que, el área de estudio (Punto C) recibe constantemente un efluente de agua residual influenciando significativamente en este proceso. En este apartado, se muestra que las concentraciones virales en el desarrollo del *biofilm* también, resultan ser un factor importante al igual que el análisis microbiano. Como se mencionó en secciones anteriores, las superficies de las membranas están cubiertas con biopelículas que ofrecen sitios de adsorción para sólidos, coloides, sustancias poliméricas, pero también para patógenos entéricos, incluidos virus y protozoos [72]. El *biofouling* formado en la membrana principalmente por colonias bacterianas podría considerarse también como un hábitat propicio para las entidades víricas, ya que, para cumplir su ciclo lítico o lisogénico únicamente necesita interactuar con la maquinaria metabólica de un huésped bacteriano. Si esta interacción entre los patógenos víricos y las biopelículas formadas por bacterias producirían la inactivación de virus patógenos podría considerarse un tratamiento eficiente de agua. Sin embargo, Skrabber et. al, [68], describe en su estudio que los microorganismos asociados al *biofouling* pueden desprenderse de la superficie en el arrastre del flujo de permeado por lo que, causaría a una posible liberación de los patógenos del sistema de desinfección. Es por esto que, el uso de la ultrafiltración para eliminar virus de las aguas residuales se encuentra limitado por su diminuto tamaño y el tamaño del poro de las membranas que es relativamente más grande que los virus [69]. En otro estudio, se observó una disminución de la permeabilidad de la membrana debido a la gran cantidad de microorganismos presentes en la corriente de alimentación. Es por tal razón, que si se requiere de una total eliminación de patógenos Zadrow et. al, 2009 [71], sugiere disminuir el tamaño de poros y aumentar las fuerzas repulsivas ejercidas por las

bioincrustaciones. Por ejemplo, varios estudios describen que los patógenos entéricos, mismos que son característicos de habitar en aguas residuales, son capaces de sobrevivir más tiempo cuando se asocian con materia orgánica que cuando se encuentran libres en el flujo de agua del sistema natural [73, 74]. En este contexto, el efecto de protección que brinda la biopelícula puede lograr la persistencia de los patógenos virales dentro del biofilm. Sin embargo, este comportamiento únicamente sucederá si las concentraciones de las bacterias fecales disminuyen dentro de las biopelículas, ya que su presencia por un largo periodo de tiempo puede reducir su cultivabilidad [72]. Por otro lado, si este no es el caso se corre el riesgo que los virus viajen desde la superficie de la membrana hacia el flujo de permeado comprometiendo la salud de la población. Teniendo en cuenta lo mencionado previamente, los resultados microbiológicos de este estudio (Figura 3) y la corriente de alimentación del sistema de UF (alta carga) se esperaría que los resultados posteriores fueran positivos para la persistencia de virus entéricos en este tipo de muestras de agua superficial. Finalmente, investigaciones mecanicistas recientes determinaron que el aumento de la eliminación de los virus solo fue posible gracias a la disminución del tamaño de los poros y las fuerzas de interacción virus-membrana [75]. Este tipo de energías entre ambos componentes (virus-membrana) evitan que los virus entre al interior de los poros de la membrana incluso, si estos son de mayor tamaño del virus [76]. Esta técnica se realiza modificando las fuerzas de interacción a través del pH, fuerza iónica y tipos de iones, haciendo que las partículas virales presentes en el flujo de agua sean succionadas hacia la membrana impidiendo el paso hacia el flujo de permeado [77,78]. Cabe recalcar, que este tipo de herramientas no se han aplicado a nivel industrial, sin embargo, son opciones factibles y viables para estudios posteriores.

#### **4.3.4 Análisis de la presencia de comunidades bacterianas en el *biofouling* mediante detección molecular**

La presencia de las bandas amplificadas en la figura 13, ayudan a argumentar que los resultados de los análisis moleculares están estrechamente relacionados con los resultados microbiológicos obtenidos (Figura 3) y la formación de la biopelícula a partir de la colonización bacteriana en la superficie de la membrana de UF. Las PTAR son considerados depósitos de gran cantidad de bacterias, es por eso, que en el presente

estudio se evidenció el impacto de los efluentes en aguas abajo a la descarga de las aguas residuales. El análisis tanto de los experimentos microbiológicos y moleculares reveló que el agua superficial de la zona urbana (Punto C2) está compuesta en su mayoría por comunidades bacterianas pertenecientes a coliformes fecales y termotolerantes. Siguiendo el estudio de Drury et. al, 2013, [79] describe que en sistemas urbanos y semiurbanos existe gran abundancia de Proteobacterias y Bacteroides, las mismas que al recibir un efluente de la PTAR su estructura biológica se modifica y la abundancia y diversidad bacteriana se reduce significativamente. En esta investigación se empleó la técnica de PCR utilizando cebadores específicos para la detección del gen que codifica para la subunidad 16S del rARN de las bacterias. Aunque esta técnica por sí sola no permita establecer la especie del organismo analizado, pero si confirmar su presencia, es posible asumir que tipo de microorganismos bacterianos contiene el *biofouling*, gracias a los resultados físicoquímicos, microbiológicos y tasación de biomasa bacteriana acumulada obtenidos anteriormente. Sin embargo, es importante mencionar que se requieren estudios posteriores acerca de este tema.

En este contexto, fue posible obtener bandas de alta calidad e intensidad para las tres membranas (CPM: 100, 30 Y 10 kDa) confirmando de esta manera la ocurrencia y prevalencia de bacterias tanto en la corriente de alimentación como en la contribución al desarrollo del *biofouling* (Figura 13). De acuerdo a la bibliografía [78, 80], al tratarse de la muestra de agua superficial que contiene alta cargas de contaminantes emergentes y biológicos la amplificación de bacterias gramnegativas de los géneros: Bacteroides (Flavobacteria, Sphingobacteria y Cythophagia) y Proteobacterias (*E. coli*, *Salmonella*, *V. Helicobacer* y *Neisseria*) es muy común que amplifique sus fragmentos de ADNbc entre 670pb y 1500pb respectivamente (Figura 13). Las Proteobacterias son consideradas bacterias heterótrofas capaces de degradar compuestos orgánicos de alto peso molecular [81]. Por lo tanto, cuando existe mayor abundancia de este género en el sitio urbano indica, que podría haber sido resultado de la adición de altas concentraciones exógenas de compuestos perjudiciales contenidos en la PTAR hacia el sistema de agua dulce natural. Debido a las características físicoquímicas analizadas (Tabla 3) es probable también, que el efluente de agua residual haya cambiado significativamente la diversidad autóctona bacteriana, con el propósito de que estas se

adapten a nuevas condiciones bruscas como: la excesiva presencia de nitrato y amonio. De acuerdo al estudio realizado por Druy et. al, 2013 [79] en presencia de un flujo constante de agua residual la composición de las comunidades bacterianas en las zonas aguas abajo a la desembocadura se observa un aumento significativo en la abundancia en el filo de bacterias de Nitrospirae. Las especies de Nitrospira son bacterias gramnegativas que se encargan de catalizar el proceso de nitrificación oxidando al nitrito presente en agua dulce, perjudicando la salud del mismo [82]. Así mismo, gracias a los análisis microbiológicos se determinó que en el sitio de estudio domina la concentración de bacterias coliformes, indicando de esta manera que existe una alta contaminación fecal en el cuerpo de agua estudiado. Estos resultados revelan que las bandas obtenidas en el análisis molecular confirmarían la existencia de las Enterobacteriace (bacterias coliformes). Si bien es cierto, muchas bacterias pertenecientes a este género son inofensivas, sin embargo *E. coli* es capaz de causar diversas enfermedades en los seres humanos cuando está en contacto con toxinas patógenas provenientes de las descargas residuales [83].

#### **4.3.5 Análisis de la presencia de virus entéricos presentes en el *biofouling* mediante detección molecular**

Como ya se ha descrito anteriormente, las aguas residuales son una fuente importante de propagación de microorganismos patógenos en el medio acuático de agua dulce. Aproximadamente existen 140 tipos de virus que son capaces de contaminar los cursos de agua, sin embargo, el género enterovirus son los detectados con mayor frecuencia [84]. Los virus entéricos son más importantes en términos de patogenicidad, ya que, frecuentemente son aislados de agua contaminada con heces y de aguas residuales sin tratar o con un tratamiento deficiente [85]. En el presente estudio, fue posible determinar la presencia positiva de adenovirus en la muestra de agua analizada (Figura 14) mediante la técnica de PCR convencional. A pesar, de que dicha técnica no permita identificar con mayor especificidad que serotipo de Adenovirus prevalece en la zona urbana del río Tena, gracias a los cebadores y bibliografía es posible hipotetizar los resultados. Cabe recalcar, que estos resultados proporcionan información base

primordial sobre los virus que circulan en esta zona, siendo de gran ayuda para futuras exploraciones.

Dentro de este contexto, la figura 14 presenta bandas sutiles (140 – 160 pb) en lo que respecta a las membranas de 30 y 10 kDa. Debido a que estas membranas también demostraron mayor capacidad de retención de biomasa bacteriana (Tabla 10) y mayor prevalencia de microorganismos (BMA y Coliformes) (Tabla 4), dando como primera explicación la amplificación de Adenovirus (HAdV) únicamente en estos dos carriles. Debido a que, los adenovirus son considerados indicadores alternativos de contaminación fecal en los ambientes acuáticos [90]. Es por esta razón que, Rigotto et. al, 2009 [85], indica que en varios estudios se ha demostrado la presencia de HAdV en varias fuentes de muestras de agua, principalmente en aguas residuales y agua de río; debido a que, las condiciones fisicoquímicas y microbiológicas imperantes del sistema natural han sido perturbadas por efecto antropogénico. Teniendo en cuenta los resultados fisicoquímicos y microbiológicos realizados en la presente investigación, se considera que existe una gran proporción de virus (HAdV) en las muestras de agua superficial examinadas. Sin embargo, al presentar bandas débiles (Figura 14) es muy probable que únicamente se haya amplificado los fragmentos de ADN bicatenario de Adenovirus más no, el ADN completo. Kuo et. al, 2010 y Papavenkis et. al, 2005 [87,88] mencionan que esto puede suceder generalmente cuando se trabaja con aguas negras (aguas contaminadas por aguas residuales) ya que estas, contienen grandes cantidades de compuestos orgánicos que pueden interferir con la adsorción del virus a la superficie de la membrana. Además, se conoce que una gran proporción de virus que se encuentran contenidos en aguas residuales están asociadas a sólidos, lo que provoca limitaciones técnicas significativas en el proceso de UF debido a la elución incompleta del virus [89,90]. Según Kuo et. al, [87], cuando la extracción y amplificación del ADNbc del HAdV se realiza a partir de un medio de cultivo, este suele presentar bandas en 400 pb aproximadamente. Sin embargo, el estudio realizado por Santos et. al, 2004 [89] determinó dos fragmentos que muestran 191 pb y 110 pb sugiriendo de esta forma, la presencia de virus entérico (HAdV) al igual que en este estudio por la naturaleza de la muestra analizada.

Así mismo, los sólidos en suspensión y la materia orgánica coloidal disuelta en la corriente de alimentación pueden obstruir el filtro de membrana y competir con los virus por los sitios de adsorción, lo que conduce a una disminución de la eficiencia de la adsorción de las partículas de HAdV [90]. Por otra parte, la carga electrostática de los adenovirus es negativa y las membranas de PES son hidrofóbicas, haciendo que los virus no sean retenidos de una manera eficiente en la superficie de membrana y provocando su paso hacia el flujo de permeado. Además, del mayor tamaño de los poros y las fuerzas electrostáticas ejercidas en la membrana, es aceptable que la membrana de 100 kDa no amplifique ninguna banda ya que, es muy posible que los virus hayan sobrepasado la membrana hacia el flujo de permeado. Este panorama, provoca problemas en la desinfección, pues no está siendo óptima en el proceso de UF para generar la potabilización de agua. Estos virus (HAdV), usualmente cumplen una ruta fecal-oral y generalmente son excretados en las heces humanas, las mismas que serán transportadas hacia las PTAR, para después volver a ingresar al sistema hídrico natural como una descarga de agua residual; que en su mayoría son empleadas en diferentes actividades, comprometiendo a la salud de los habitantes. Dentro de este contexto, surge una nueva hipótesis sobre los resultados encontrados (Figura 14I) puesto que, si los HAdV cumplen la ruta antes mencionada, la probabilidad de encontrar en esta investigación adenovirus del serotipo HAdV-40 y HAdV-41 F es alta; ya que, estos son patógenos virales de origen humano causantes de la gastroenteritis [91]. Es por esta razón, que para obtener un correcto análisis de calidad de agua emplear virus entéricos como indicadores de contaminación severa en ambientes acuáticos es la mejor opción. Debido a que se ha demostrado que los HAdV son 60 veces más resistentes a la radiación UV y a toda clase de desinfecciones realizadas en las PTAR, permaneciendo infeccioso por largos periodos de tiempo [92]. Otra hipótesis planteada, está relacionada con los desbordes de los alcantarillados en las zonas urbanas y semiurbanas. En donde, al existir altas precipitaciones se combinan aguas pluviales y aguas residuales sin tratar contribuyendo a altas concentraciones de patógenos transmitidos por el agua, especialmente virus [95]. Este comportamiento describe Fong et. al, 2009 [91], que sucede en las ciudades antiguas de Michigan al igual que en la ciudad de Tena, ya que ambos lugares presentan eventos de alta precipitación los cuáles, podrían ser los principales contribuyentes a la contaminación microbiana de las aguas superficiales.

## CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 5.1 Conclusiones

Después de haber evaluado la capacidad del proceso de UF a partir de agua superficial de un sistema fluvial urbano que recibe periódicamente un efluente de agua residual, se considera que la aplicación de UF directa resulta ser una alternativa efectiva pero no completa en la remoción de contaminantes. La UF se considera un proceso prometedor para la potabilización de agua únicamente si esta contiene bajas concentraciones de contaminantes.

Se determinó las concentraciones de parámetros fisicoquímicos y UFC de bacterias pertenecientes a las muestras de agua superficial de alta carga, empleando membranas con diferentes CPM (100, 30 y 10 kDa). Todos los parámetros analizados en el Punto C1 antes de la descarga de agua residual no cumplieron con los LMP propuestos por la legislación ecuatoriana establecidos por el TULSMA. Sin embargo, al aplicar la UF empleando las membranas de 30 y 10 kDa la remoción de contaminantes alcanzó entre un 70% y 80%, obteniendo concentraciones que bordeaban los estándares permitidos establecidos por el INEN. Sin embargo, la membrana de 100 kDa únicamente alcanzó una remoción del 50% para BMA, mientras que ninguna de las tres membranas logró una remoción completa de coliformes fecales presentes en el agua superficial.

El *fouling* formado en la superficie de la membrana se determinó como el principal problema y desventaja en el proceso de UF ya que, la formación de esta biopelícula reduce el volumen de permeado y ensucia más rápido la membrana; lo cual, se ve reflejado en mayor gasto energético y por ende los costos de mantenimiento aumentan. Los análisis de desarrollo del *fouling* se realizaron utilizando las tres diferentes membranas (CPM: 100, 30 y 10 kDa). En donde, fue posible demostrar que aquellas membranas que poseen un CPM menor (30 y 10 kDa) presentaron mayor ensuciamiento, el tiempo de formación de la torta fue menor y por consiguiente presentaron una disminución en el flujo de permeado en comparación con la membrana de 100 kDa. Por otro lado, la membrana de 100 kDa no logró una desinfección óptima de los contaminantes, pero, en términos de los parámetros de UF está obtuvo un mayor rendimiento debido a fue la única membrana con tasas bajas de la pérdida de flujo.

El análisis de los mecanismos de poro suscitados en cada membrana de UF permitió mejorar la comprensión de la secuencia de los mismos y el comportamiento de las interacciones de la materia (coloides y polímeros) y la membrana. Se determinó que el modelo matemático de polímeros fue aquel que presentó un mejor comportamiento ya que, las tres membranas exhibieron todos los mecanismos de bloqueo de poro en el orden propuesto (Bloqueos: Completo, Estándar, Intermedio y Formación de torta). Mientras, que el modelo para coloides únicamente presento bloqueo completo en la membrana de 10 kDa. Para cada uno de los modelos, existió un mecanismo que dominó todo el proceso de UF, en lo que respecta al modelo de coloides fue el mecanismo de bloqueo de poro estándar, mientras que para el modelo de polímeros fue el completo, ambos, con una pérdida de flujo de permeado del 75%.

Así mismo, se concluye que el parámetro de la permeabilidad de la membrana y la secuencia de los mecanismos de bloqueo de poro dependerán de las características de la corriente de alimentación y del tamaño de poro de la membrana. Al analizar una muestra de agua superficial de alta carga debido, a las descargas de aguas residuales se observó, que las membranas de 30 y 10 kDa tuvieron mayor capacidad de formar *fouling*, sin embargo, presentaron menor permeabilidad. La formación de este *biofouling* está estrechamente relacionada con las altas concentraciones de colonias microbianas adheridas a la superficie de la membrana, provocando el rápido taponamiento de los poros. También, al presentar bioincrustaciones dominadas por bacterias se deduce, que la mayoría de *biofouling* formado en el proceso de UF contiene en altas cantidades sustancias poliméricas excretadas (SPE) por estos microorganismos.

En este estudio se reporta que la naturaleza de la corriente de alimentación (alta carga) influye de manera significativa en la formación del *biofouling*, sobre todo en las etapas iniciales. Al tratarse de agua superficial con abundancia de sólidos, materia orgánica-inorgánica, coloides y polímeros previo a la formación de torta, se desarrolla un prefiltro en donde, los microorganismos bacterianos serán capaces de adherirse para después iniciar con la secreción de SPE y con la señalización química para dar inicio al *Quorum sensing* y a la formación de la torta hasta alcanzar una estructura tridimensional.

Finalmente, gracias a la detección molecular fue posible determinar la ocurrencia y prevalencia de comunidades bacterianas y virus entéricos contenidos en el *biofouling*. Debido a las características fisicoquímicas y microbiológicas determinadas en esta investigación se concluye, de manera previa a la secuenciación metagenómica que el *biofouling* depositado en las membranas es posible que contenga bacterias patógenas debido a la presencia de microorganismos indicadores. Además, los resultados obtenidos sugieren también que el efluente de la PTAR tiene el potencial de reducir la variabilidad autóctona del río Tena. Es decir, gracias a las altas cantidades de nitratos y amonio incorporados por esta descarga es posible encontrar también bacterias del género Nitrospirae, causando la homogeneización biótica y perjudicando a salud del río. Con respecto a los virus entéricos analizados, se determinó que los principales indicadores de contaminación fecal son los Adenovirus (HdTV) para los cuáles se obtuvieron resultados positivos, encontrándose en el *biofouling* formado en las membranas de 30 y 10 kDa. También, las bandas tenues se infieren a la existencia de fragmentos de ADNbc de HdTV debido, a las altas concentraciones de sólidos, coloides y ácidos húmicos, los cuales limitan la adsorción de los virus hacia la membrana. Así mismo, al describir la ruta fecal-oral del Adenovirus se cree que los fragmentos identificados corresponden a los serotipos HdTV-40 y HdTV-41.

## 5.2 Recomendaciones

Con respecto a la eficiencia del sistema de UF los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos cuantificados en el agua superficial de la zona urbana del río Tena no fueron removidos al 100% con ninguna de las tres membranas (CPM: 100, 30 y 10 kDa) a pesar, de que si disminuyeron notablemente su concentración. Es por esto, que se recomienda el uso de un sistema de pretratamiento de la muestra antes de ser sometida al sistema de UF o a su vez, establecer una estrategia de postratamiento del agua filtrada antes de ser empleada en las diversas actividades humanas. Con el objetivo de prevenir enfermedades en la población que reside en zonas aledañas al curso fluvial de agua dulce. También, es recomendable montar una fase previa de tratamiento de la muestra para reducir el desarrollo del *fouling*, aumentar el periodo de vida útil de la membrana y reducir costos en mantenimiento.

De acuerdo a los análisis moleculares, es necesario e importante continuar los experimentos con técnicas ómicas como, la secuenciación metagenómica de los fragmentos de 16s y HdTV encontrados. Dichos resultados permitirán confirmar que la biomasa calculada en el presente estudio pertenece a colonias bacterianas y a partículas virales con importancia de patogenicidad humana. Cabe recalcar, que los resultados obtenidos mediante PCR y electroforesis son de gran ayuda para iniciar un proceso exploratorio en una zona en la que no se ha realizado ninguna investigación similar. Así mismo, para obtener mejores resultados en la sección de biología molecular se recomienda, realizar un cultivo del sedimento adherido a la membrana y así evitar la presencia de inhibidores en la amplificación, que pueden ser provenientes de los materiales de la membrana. Finalmente, es de vital importancia continuar con el análisis del viroma de las aguas superficiales del río Tena ubicadas zonas abajo de la descarga de la PTAR, debido a la presencia elevada de bacterias del género Enterobacteriaceae.

Para estudios posteriores, se recomienda realizar la toma de datos fisicoquímicos y microbiológicos en diferentes estaciones meteorológicas (invierno o verano) para evaluar los cambios en la naturaleza de la corriente de alimentación y evaluar el funcionamiento del sistema de UF. También, es recomendable cuantificar el caudal en cada toma de la muestra de agua superficial del río Tena, sobre todo si el estudio se realiza en lugares que tienden a presentar fuertes precipitaciones.

## REFERENCIAS

Perujo, N., Freixa, A., Vivas, Z., Gallegos, AM, Butturini, A., y Romaní, AM. Las biopelículas fluviales de los ríos superiores e inferiores responden de manera diferente a los insumos de la planta de tratamiento de aguas residuales. *Hydrobiologia* , (2016); 765 (1), 169-183.

Wakelin, S. A., Colloff, M. J., & Kookana, R. S. Effect of Wastewater Treatment Plant Effluent on Microbial Function and Community Structure in the Sediment of a Freshwater Stream with Variable Seasonal Flow. *Applied and Environmental Microbiology*. (2008); 74(9), 2659–2668. doi:10.1128/aem.02348-07

Renesto, P., Gouvernet, J., Drancourt, M., Roux, V., & Raoult, D. *Use of rpoB Gene Analysis for Detection and Identification of Bartonella Species*. *Journal of Clinical Microbiology*. (2001); 39(2), 430–437. doi:10.1128/jcm.39.2.430-437.2001

Ricart, M., Guasch, H., Alberch, M., Barceló, D., Bonnineau, C., Geiszinger, A., ... y Proia, L. La persistencia del triclosán a través de plantas de tratamiento de aguas residuales y sus posibles efectos tóxicos en las biopelículas de los ríos. *Toxicología acuática* , (2010); 100 (4), 346-353.

Wetzel, R. G. *Limnology: Lake and river ecosystems*. San Diego: Academic Press. (2001).

Oves, M., Saghir Khan, M., Huda Qari, A., Nadeen Felemban, M., Almeelbi, T. Heavy metals: biological importance and detoxification strategies. *J. Bioremed.Biodegr.* (2016); 7,334.

MAE-Napo 2008. Base cartográfica SNAP, bosques protegidos y Patrimonio forestal escala 1:50.000 (CD).

Dungeni, M., Van der Merwe, R. ., & Momba, M. Abundance of pathogenic bacteria and viral indicators in chlorinated effluents produced by four wastewater treatment plants in the Gauteng Province, South Africa. *Water SA*, (2010);36(5). doi:10.4314/wsa.v36i5.61994.

Hughes, B., Beale, D. J., Dennis, P. G., Cook, S., & Ahmed, W. Cross-Comparison of Human Wastewater-Associated Molecular Markers in Relation to Fecal Indicator Bacteria and Enteric Viruses in Recreational Beach Waters. *Applied and Environmental Microbiology*. (2017); 83(8). doi:10.1128/aem.00028-17.

A. Sowers The effects of wastewater effluent on a fish and amphibian species Clemson University (2009).

M, Majedul, E. Sokolova y N.Hofstra. Modelling of river faecal indicator bacteria dynamics as a basis for faecal contamination reduction (2018).

WHO World Health Organisation Global Data Repository Available at: <http://apps.who.int/ghodata/>:WorldHealthOrganisation 2012 Accessed on 23/08/2016.

Gao W, Liang H, Ma J, Han M, Chen Z lin, Han Z shuang, et al. Membrane fouling control in ultrafiltration technology for drinking water production: A review. *Desalination*. 2011. pp. 1–8. doi:10.1016/j.desal.2011.01.051

Zeman, L. J., & Zydney, A. *Microfiltration and ultrafiltration: principles and applications*. CRC Press. (2017).

Mehta, A., & Zydney, A. L. *Permeability and selectivity analysis for ultrafiltration membranes*. *Journal of Membrane Science*, 249(1-2), (2005) 245–249. doi:10.1016/j.memsci.2004.09.040 66

Abdessemed, D., Nezzal, G., & Ben Aim, R.. *Coagulation—adsorption—ultrafiltration for wastewater treatment and reuse*. *Desalination*, (2000) 131(1-3), 307–314. doi:10.1016/s0011-9164(00)90029-8

Goh, P. S., Ng, B. C., Lau, W. J., & Ismail, A. F. *Inorganic Nanomaterials in Polymeric Ultrafiltration Membranes for Water Treatment*. *Separation & Purification Reviews*, (2014); 44(3), 216–249. doi:10.1080/15422119.2014.926274

Howe, K. J., & Clark, M. M. *Fouling of Microfiltration and Ultrafiltration Membranes by Natural Waters*. *Environmental Science & Technology*. (2002);36(16), 3571–3576. doi:10.1021/es025587r

Zhan, M., Gwak, G., Kim, D. I., Park, K., & Hong, S. Quantitative analysis of the irreversible membrane fouling of forward osmosis during wastewater reclamation: Correlation with the modified fouling index. *Journal of Membrane*. (2019).

Herrera-Robledo M, Noyola A. The evolution of pore-blocking during the ultrafiltration of anaerobic effluent-like mixtures. *Sep Purif Technol*. 2015;147: 172–178. doi:10.1016/j.seppur.2015.04.027

Wang F, Tarabara V V. Pore blocking mechanisms during early stages of membrane fouling by colloids. *J Colloid Interface Sci*. 2008;328: 464–469. doi:10.1016/j.jcis.2008.09.028

Wingender, J., 2011. Hygienically relevant microorganisms in biofilms of man-made water systems. In: Flemming, H.-C., Wingender, J., Szewzyk, U. (Eds.), *Biofilm Highlights*.

Grøndahl-Rosado, R.C., Tryland, I., Myrmel, M. et al. Detection of Microbial Pathogens and Indicators in Sewage Effluent and River Water During the Temporary Interruption of a Wastewater Treatment Plant. *Water Qual Expo Health* 6, 155–159 (2014). <https://doi.org/10.1007/s12403-014-0121-y>

GAD Municipal de Tena. (2014). Actualización plan de desarrollo y ordenamiento territorial.

American Public Health Association (APHA). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 17th edition. 18th ed. American Public Health Association; 1992.

Kim J, DiGiano FA. Fouling models for low-pressure membrane systems [Internet]. *Separation and Purification Technology*. 2009. pp. 293–304. doi:10.1016/j.seppur.2009.05.018

Amjad H, Khan Z, Tarabara V V. Fractal structure and permeability of membrane cake layers: Effect of coagulation-flocculation and settling as pretreatment steps. *Sep Purif Technol*. 2015;143: 40–51. doi:10.1016/j.seppur.2015.01.020

Carman PC. Fluid flow through granular beds. *Process Saf Environ Prot Trans Inst Chem Eng Part B*. 1997;75. doi:10.1016/s0263-8762(97)80003-2

Kozeny J. Ueber kapillare Leitung des Wassers im Boden. *Sitzungsber. Abt IIa d Math naturwiss Klasse der Wiener Akad Wiss*. 1927;136: 271–306. doi:10.4236/ica.2011.24037

Hermia J. Constant Pressure Blocking Filtration Laws: Application To Power-Law Non-Newtonian Fluids. *Trans Inst Chem Eng*. 1982;60: 183–187.

Ye Y, Le Clech P, Chen V, Fane AG, Jefferson B. Fouling mechanisms of alginate solutions as model extracellular polymeric substances. *Desalination*. 2005;175: 7–20. doi:10.1016/j.desal.2004.09.019 67

Frank, J. A., Reich, C. I., Sharma, S., Weisbaum, J. S., Wilson, B. A., & Olsen, G. J. *Critical Evaluation of Two Primers Commonly Used for Amplification of Bacterial 16S rRNA Genes*. *Applied and Environmental Microbiology*. (2008); 74(8), 2461–2470. doi:10.1128/aem.02272-07

Heim, A., Ebnet, C., Harste, G., & Pring-Åkerblom, P. *Rapid and quantitative detection of human adenovirus DNA by real-time PCR*. *Journal of Medical Virology*,. (2003);70(2), 228–239. doi:10.1002/jmv.10382

Herrera-Robledo M, Cid-León DM, Morgan-Sagastume JM, Noyola A. Biofouling in an anaerobic membrane bioreactor treating municipal sewage. *Sep Purif Technol*. 2011;81: 49–55. doi:10.1016/j.seppur.2011.06.041

Flemming, H. C., Szewzyk U, Griebe T. *Biofilms: Investigative Methods and Applications*. 1st ed. CRC Press; 2000.

Neidhardt FC., Ingraham JL., Schaechter M. *Physiology of the bacterial cell: A molecular approach*. Trends in Genetics. Sunderland: MA: Sinauer Associates; 1990. doi:10.1016/0168-9525(91)90427-r

Jetten, M. S. M., Sliemers, O., Kuypers, M., Dalsgaard, T., van Niftrik, L., Cirpus, I., ... Strous, M. Anaerobic ammonium oxidation by marine and freshwater planctomycete-like bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*. (2003);63(2),107–114. doi:10.1007/s00253-003-1422-4

Posada J., Roldán G. y Ramírez J. Caracterización fisicoquímica y biológica de la calidad de aguas de la cuenca de la quebrada Piedras Blancas, Antioquia, Colombia. (2000).

Morales B. y Chávez G. Estimación de la carga de nutrientes procedentes de la cuenca de drenaje superficial del río Tepenaguasapa. (2010)

Cárdenas Calvachi Gloria Lucia, Sánchez Ortiz Iván Andrés. Nitrógeno en aguas residuales: orígenes, efectos y mecanismos de remoción para preservar el ambiente y la salud pública. *Univ. Salud [Internet]*. 2013 June [cited 2020 Sep 01] ; 15( 1 ): 72-88. Available from: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0124-71072013000100007&lng=en](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0124-71072013000100007&lng=en).

Sardiñas Peña Olivia, Pérez Cabrera Adisbel. Determinación de nitrógeno amoniacal y total en aguas de consumo y residuales por el método del fenato. Rev Cubana Hig Epidemiol. 2004 [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1561-30032004000200002&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-30032004000200002&lng=es) 68

Ávila, Hendrik, Tudares, Carmen, Sánquiz, Miriam, Araujo, María, Morales, Nerva, Rojas, José, & Pirela, Danis. Nitrógeno y fósforo en aguas superficiales de la parte baja del río Catatumbo. Revista Técnica de la Facultad de Ingeniería Universidad del Zulia, 30(Especial), (2007);29-35.

Ortiz, Iván Andrés, Gebara, Dib, Dall'Aglio Sobrinho, Milton, Matsumoto, Tsunao, Remoción de fósforo de diferentes aguas residuales en reactores aeróbios de lecho fluidizado trifásico con circulación interna. Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia. 2013; (67): 172-182.

Capote T., Matute S. y Rojas J. Total hardness water determination by EDTA using a colorless buffer borate. Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael. (2015) [RfangelRangeldalyc.org/articulo.oa?id=43029146015](http://RfangelRangeldalyc.org/articulo.oa?id=43029146015)

Chávez J., Leiva D. y Corrito F. Physicochemical and microbiological characterization of wastewater in the Chachapoyas city, Amazonas Region. Universidad Científica del Perú Ciencia Amazónica (Iquitos). (2016); 6 (1), 16.

Kirschner, A. K. T., Reischer, G. H., Jakwerth, S., Savio, D., Ixenmaier, S., Toth, E., ... Farnleitner, A. H. Multiparametric monitoring of microbial faecal pollution reveals the dominance of human contamination along the whole Danube River. Water Research, (2017); 124, 543–555.

Kavka G., Kasimir G. y Farnleitner. Microbiological water quality of the River Danube (km 2581 - km 15): (2006).

Longitudinal variation of pollution as determined by standard parameters. Federal Ministry of Agriculture, Forestry, Environment and Water Management, Federal Agency for Water Management. HYDRA-Institute Österreich, Himmelstrasse 42, A-1190 Vienna

Hunter, C, J. Perkins, J. Tranter, and P. Harwick. Fecal bacteria in the waters and upland area in Derbyshire, England: The influence of agricultural land use. J. Environ. Qual. 2000 ;29: 1253-1261

Rodríguez, Silvia, Gauna, Luciana, Martínez, Gloria, Acevedo, Hugo, & Romero, Cesar. Relación del nitrato sobre la contaminación bacteriana del agua. Terra Latinoamericana. (2012); 30(2), 111-119.

Berg Gerald. Methods For Recovering Viruses From The Environment. CRC Press,. Berg Gerald, editor. Boca Raton; 1987.

Aguiar Roque, Yania, Rodríguez Muñoz, Susana, Fernández Santana, Elina, & Cabrera Galdo, Edilia. Tratamiento de residuales líquidos de tenerías utilizando membranas. Ingeniería Hidráulica y Ambiental. (2017); 38(1), 113-127. 69

A.D. Marshall, P.A. Munro, G. Tragardh, Influence of permeate flux on fouling during the microfiltration of  $\beta$ -1actoglobulin solutions under cross-flow conditions, *J. Membr. Sci.* 130 (1997) 23–30

Qu, F., Liang, H., Zhou, J., Nan, J., Shao, S., Zhang, J., & Li, G. Ultrafiltration membrane fouling caused by extracellular organic matter (EOM) from *Microcystis aeruginosa*: Effects of membrane pore size and surface hydrophobicity. (2014). doi:10.1016/j.memsci.2013.07.070

Y.X. Shen, W.T. Zhao, K. Xiao, X. Huang, A systematic insight into fouling propensity of soluble microbial products in membrane bioreactors based on hydrophobic interaction and size exclusion, *J. Membr. Sci.* 346 (2010) 187–193

Bowen WR, Calvo JI, Hernández A. Steps of membrane blocking in flux decline during protein microfiltration. *J Memb Sci.* 1995;101: 153–165. doi:10.1016/0376-7388(94)00295-A

COSTA, A., DEPINHO, M., & ELIMELECH, M.. Mechanisms of colloidal natural organic matter fouling in ultrafiltration. *Journal of Membrane Science.* (2006); 281(1-2), 716–725. doi:10.1016/j.memsci.2006.04.044

Cerón-Vivas, A., and A. Noyola. "Fouling membrane in an anaerobic membrane bioreactor treating municipal wastewater." *Water Practice and Technology* 12.2 (2017): 314-321.

Chon, K., Kim, S. J., Moon, J., & Cho, J. Combined coagulation-disk filtration process as a pretreatment of ultrafiltration and reverse osmosis membrane for wastewater reclamation: An autopsy study of a pilot plant. *Water Research.* (2012); 46(6), 1803–1816. doi:10.1016/j.watres.2011.12.062

Lee, S., Lee, E., Ra, J., Lee, B., Kim, S., Choi, S.H., Kim, S.D., Cho, J., Characterization of marine organic matters and heavy metals with respect to desalination with RO and NF membranes. *Desalination.* 2008; 221, 244e252

Aguirre-Montesdeoca V, Janssen AEM, Van der Padt A, Boom RM. Modelling ultrafiltration performance by integrating local (critical) fluxes along the membrane length. *J Memb Sci.* 2019;578: 111–125. doi:10.1016/j.memsci.2019.02.040

Herrera Robledo, Miguel, et al. "Tratamiento de agua residual municipal con bio-reactores UASB de membrana: efectividad y taponamiento." *Revista AIDIS de Ingeniería y Ciencias Ambientales. Investigación, desarrollo y práctica* 1.2

Houari A, Seyer D, Couquard F, Kecili K, Démocrate C, Heim V, et al. Characterization of the biofouling and cleaning efficiency of nanofiltration membranes. *Biofouling.* 2010;26: 15–21. doi:10.1080/08927010903277749 70

Lasa I., Pozo J. L. del, Penadés J. R., Leiva J.. Biofilms bacterianos e infección. *Anales Sis San Navarra.* 2005. Disponible en: [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1137-66272005000300002&lng=es](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1137-66272005000300002&lng=es).

Nazar C Julio. Biofilms bacterianos. *Rev. Otorrinolaringol. Cir. Cabeza Cuello.* 2007. Disponible en: [https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0718-48162007000100011&lng=es](https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-48162007000100011&lng=es).

Shrout, Joshua D., and Robert Nerenberg. "Monitoring bacterial twitter: does quorum sensing determine the behavior of water and wastewater treatment biofilms?." *Environmental science & technology* 46.4 (2012): 1995-2005.

Petrovich, Morgan L., et al. "Viral composition and context in metagenomes from biofilm and suspended growth municipal wastewater treatment plants." *Microbial biotechnology* 12.6 (2019): 1324-1336.

Skraber, S., Helmi, K., Willame, R., Ferréol, M., Gantzer, C., Hoffmann, L. y Cauchie, H.-M. (2007). Ocurrencia y persistencia de indicadores fecales bacterianos y virales en biopelículas de aguas residuales. *Ciencia y tecnología del agua*, 55 (8-9), 377–385. doi: 10.2166 / wst.2007.280

Oh HS, Lee CH. Origin and evolution of quorum quenching technology for biofouling control in MBRs for wastewater treatment [Internet]. *Journal of Membrane Science*. Elsevier B.V.; 2018. pp. 331–345. doi:10.1016/j.memsci.2018.03.019

Hao, R., Li, S., Li, J., & Meng, C. Denitrification of simulated municipal wastewater treatment plant effluent using a three-dimensional biofilm-electrode reactor: operating performance and bacterial community. *Bioresource technology*. (2013); 143, 178-186.

Zodrow, Katherine, et al. "Polysulfone ultrafiltration membranes impregnated with silver nanoparticles show improved biofouling resistance and virus removal." *Water research* 43.3 (2009): 715-723.

Smith, E.M., Gerba, C.P. and Melnick, J.L. Role of sediment in the persistence of enteroviruses in the estuarine environment. *Appl. Environ. Microbiol.* (1978); 35(4), 685 –689

Karim, M.R., Manshadi, F.D., Karpiscak, M.M. and Gerba, C.P. The persistence and removal of enteric pathogens in constructed wetlands. *Wat. Res.* (2004); 38(7), 1831– 1837

Lu, Ruiqing, et al. "Improvement of virus removal using ultrafiltration membranes modified with grafted zwitterionic polymer hydrogels." *Water research* (2017): 86-94

Kim, M.-m. and Zydney, A.L. Effect of electrostatic, hydrodynamic, and Brownian forces on particle trajectories and sieving in normal flow filtration. *Journal of Colloid and Interface Science*. (2004); 269(2), 425-431

Herath, G., Yamamoto, K. and Urase, T. The effect of suction velocity on concentration polarization in microfiltration membranes under turbulent flow conditions. *Journal of Membrane Science*. (2000); 169(2), 175-183.

Brent, R., y M. Pttashne..Mechanism of action of the *lexA* gene product. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1981; 78(7):4204-8 71

Pérez-Pérez, J. Abraham, et al. "Diversity of culturable bacterial microbiota of the *Eisenia foetida* digestive tract." *Revista Fitotecnia Mexicana* 41.3 (2018): 255-264.

Drury, B., Rosi-Marshall, E., & Kelly, J. J..Wastewater Treatment Effluent Reduces the Abundance and Diversity of Benthic Bacterial Communities in Urban and Suburban Rivers. *Applied and Environmental Microbiology*. (2013); 79(6), 1897–1905.doi:10.1128/aem.03527-12

Kowalchuk, G. A., A. W. Stienstra, G. H. J. Heilig, J. R. Stephen, and J. W. Woldendorp. Molecular analysis of ammonia-oxidizing bacteria in soil of successional grasslands of the Drentsche A (The Netherlands). *FEMS Microbiol. Ecol.* 2000; 31:207–215

Altmann D, Stief P, Amann R, De Beer D, Schramm A. In situ distribution and activity of nitrifying bacteria in freshwater sediment. *Environ. Microbiol.* 2003; 5:798 –803.

S.K., Venkiteshwaran, A. and Zydney, A.L. Probing effects of pressure release on virus capture during virus filtration using confocal microscopy. *Biotechnology and bioengineering.* (2015b); (10), 2115-2122.

Cebon, A., Coci, M., Garnier, J., & Laanbroek, H. J. Denaturing Gradient Gel Electrophoretic Analysis of Ammonia-Oxidizing Bacterial Community Structure in the Lower Seine River: Impact of Paris Wastewater Effluents. *Applied and Environmental Microbiology.* (2004);70(11), 6726–6737. doi:10.1128/aem.70.11.6726-6737.2004

Organización Mundial de la Salud. Agua, saneamiento de aguas residuales e higiene. (2015).

Rigotto C, Kolesnikovas CK, Moresco V, Simões CMO, Barardi CRM. Evaluación de membranas HA cargadas negativamente en la recuperación de adenovirus humanos y virus de la hepatitis A en diferentes matrices de agua. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2005; <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000700005> .

Tong, H., Lu, Y. Effective detection of human adenovirus in hawaiian waters using enhanced pcr methods. *Virology* 8, 57 (2011). <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-57>

Kuo, DH-W., Simmons, FJ, Blair, S., Hart, E., Rose, JB y Xagorarakis, I. Evaluación de la eliminación de adenovirus humanos en un biorreactor de membrana a gran escala que trata aguas residuales municipales. *Water Research* (2010); 44 (5), 1520-1530. doi: 10.1016 / j.watres.2009.10.039

Papaventsis, D., Sifakakis, N., Markoulatos, P., Papageorgiou, GT, Kourtis, C., Chatzichristou, E.,... Levidiotou, S. *Adsorción de membrana con cultivo celular directo combinado con transcripción inversa-PCR como método rápido para identificar enterovirus de aguas residuales. Microbiología aplicada y ambiental*, 71 (1), 72–79 (2005);. doi: 10.1128 / aem.71.1.72-79.2005

Santos, FM, Vieira, MJ, Garrafa, P., Monezi, TA, Pellizari, VH, Hársi, CM y Mehnert, DU. *Discriminación de tipos de adenovirus que circulan en aguas residuales urbanas y aguas superficiales contaminadas en la ciudad de São Paulo, Brasil. Ciencia y tecnología del agua: suministro de agua.* (2004); 4 (2), 79–85. doi: 10.2166 / ws.2004.0031 72

Jiang S, Noble R, Chu W: **Human adenoviruses and coliphages in urban runoff-impacted coastal waters o Southern California.** *Appl Environ Microbiol* 2001, **67**: 179-184. 10.1128/AEM.67.1.179-184.2001

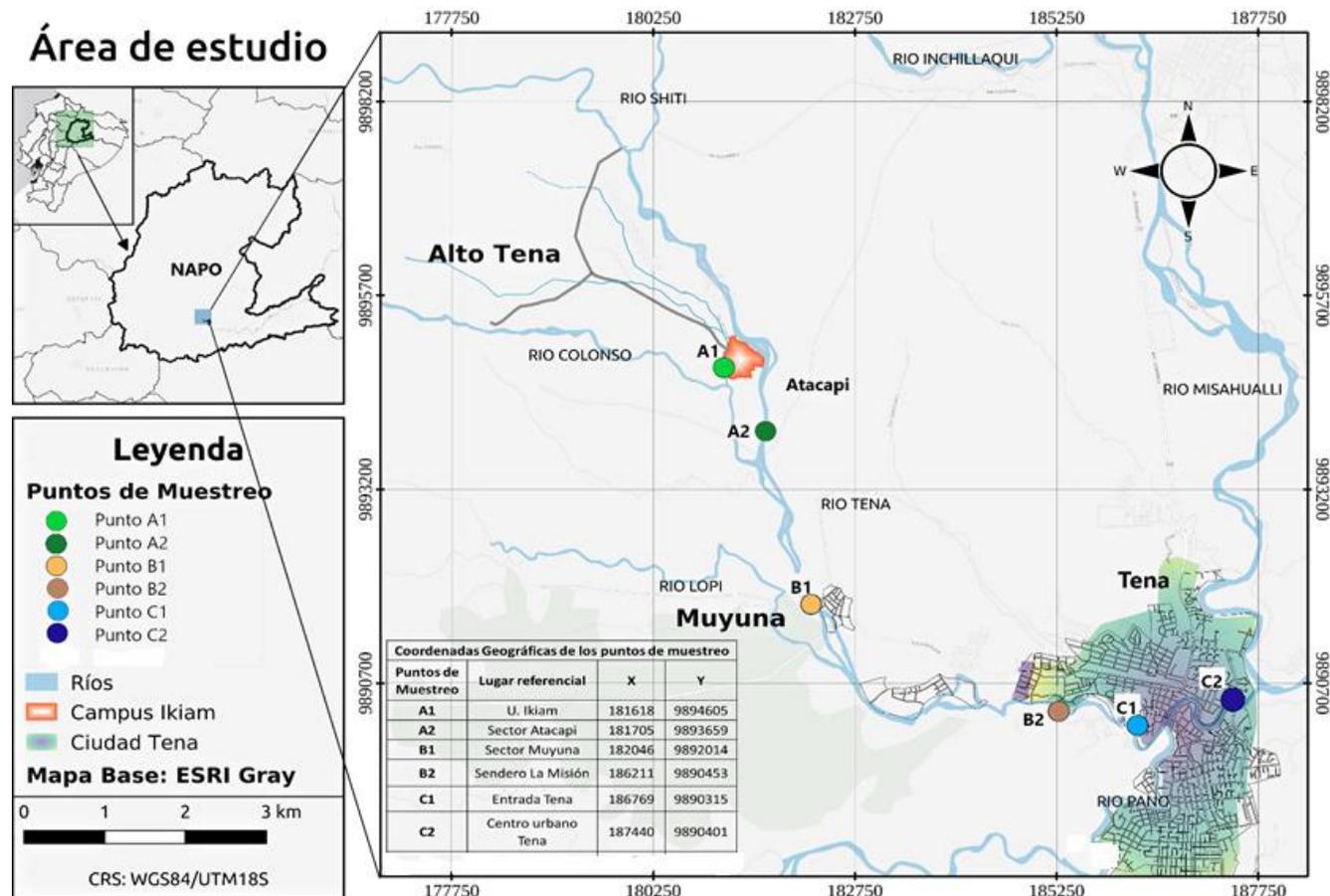
Fong, T.-T., Phanikumar, MS, Xagorarakis, I. y Rose, JB. *Detección cuantitativa de adenovirus humanos en aguas residuales y desbordamientos combinados de alcantarillado que influyen en un río Michigan. Microbiología aplicada y ambiental.* (2009); 76 (3), 715–723. doi: 10.1128 / aem.01316-09

Bourgeois, K. N., Darby, J. L., & Tchobanoglous, G. *Ultrafiltration of wastewater: effects of particles, mode of operation, and backwash effectiveness*. *Water Research*, (2001); 35(1), 77–90. doi:10.1016/s0043-1354(00)00225-6

G. La Rosa, M. Pourshaban, M. Iaconelli, M. Muscillo. Quantitative real-time PCR of enteric viruses in influent and effluent samples from wastewater treatment plants in Italy *Ann Ist Super Sanita*, 46 (2010), pp. 266-273, 10.4415/ANN-10-03-07

## ANEXOS

**Anexo 1.** Área de estudio con puntos de muestreo A (Zona prístina), B (Zona semiurbana) y C (Zona urbana).



**Fuente:** Estudio realizado por el grupo de Investigación *Hi-Water* **Punto A:** Díaz L.; **Punto B:** Urresta G.; **Punto C:** Tello S. Muestreo comprendido entre marzo-2019 y marzo 2020. Realizado y editado por Guamán S.

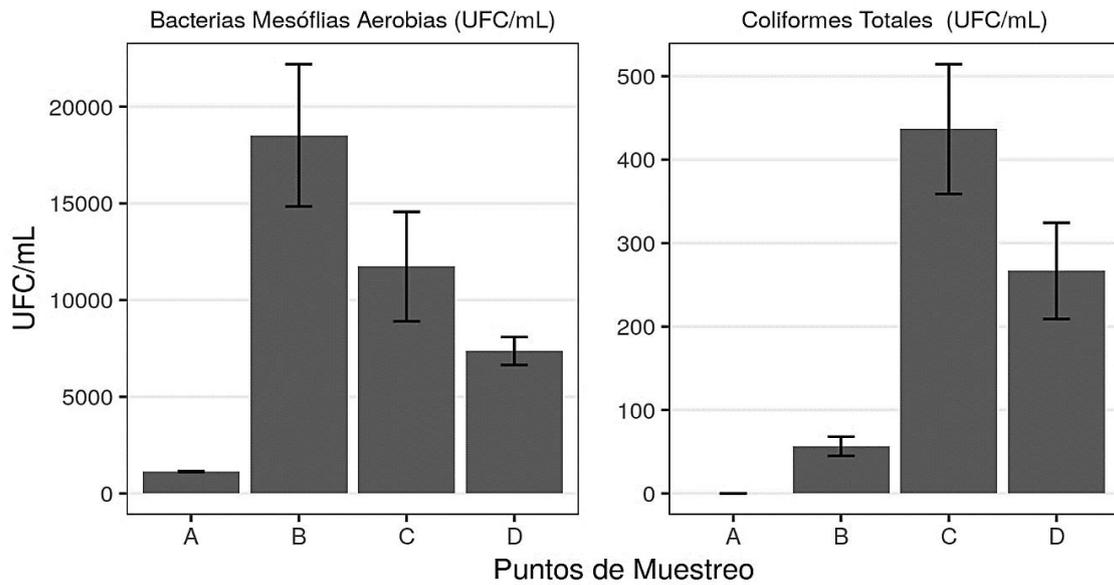
**Anexo 2.** Caracterización fisicoquímica de los puntos de muestreo a lo largo del río Tena A-C.

Parámetros (SI)	Unidades	Muestra	Punto A	Punto B	Punto C	LMP <sup>a</sup>	Norma
<b><i>In Situ</i>, nefelometría</b>							
<b>Temperatura</b>	(°C)	32	21.93 ± 0.58	22.93 ± 0.48	23.4 ± 0.1	Natural ± 3 grados	TULSMA
<b>Conductividad</b>	µs cm <sup>-1</sup>	32	31.00 ± 1.00	37.44 ± 0.58	30.33 ± 1.58	NA	NE
<b>pH</b>	Und	32	7.59 ± 0.23	6.696 ± 0.18	7.957 ± 0.14	6 a 9	TULSMA
<b>Turbidez</b>	NTU	32	5.07 ± 0.26	5.07 ± 0.78	12.7 ± 2.272	100.0	TULSMA
<b>Color</b>	Hazen, Pt/Co	32	29.00 ± 2.65	24.67 ± 3.024	53 ± 7.70	100	TULSMA
<b>Nutrientes</b>							
<b>Nitritos <sup>b</sup></b>	mgL <sup>-1</sup>	32	0.004 ± 0.001	0.004 ± 0.001	0.006 ± 0.002	1.0	TULSMA
<b>Nitratos</b>	mgL <sup>-1</sup>	32	0.580 ± 0.082	0.57 ± 0.114	0.6 ± 0.123	10.0	TULSMA
<b>Amoníaco</b>	mgL <sup>-1</sup>	32	0.133 ± 0.015	0.517 ± 0.143	0.437 ± 0.08	1.0	TULSMA
<b>Fosfatos</b>	mgL <sup>-1</sup>	32	0.267 ± 0.032	0.237 ± 0.067	0.35 ± 0.11	0.1	TULSMA
<b>Metales y Dureza</b>							
<b>Manganeso</b>	mgL <sup>-1</sup>	32	0.01 ± 0.001	0.027 ± 0.005	0.03 ± 0.009	0.1	TULSMA
<b>Hierro</b>	mgL <sup>-1</sup>	32	0.16 ± 0.01	0.477 ± 0.085	0.21 ± 0.067	0.3	TULSMA
<b>Dureza Ca</b>	mgL <sup>-1</sup>	32	6.69 ± 0.60	9.34 ± 1.376	11.72 ± 0.885	500	TULSMA
<b>Dureza Mg</b>	mgL <sup>-1</sup>	32	1.90 ± 0.13	2.16 ± 0.226	2.57 ± 0.27	500	TULSMA
<b>Microbiológicos</b>							
<b>BMA</b>	UFC· mL <sup>-1</sup>	6	1.1x10 <sup>3</sup> ± 29	18.5x10 <sup>3</sup> ± 3670	11.7x10 <sup>3</sup> ± 2831	NA	NE
<b>Coliformes totales</b>	UFC·mL <sup>-1</sup>	6	<1	60 ± 12.23	440 ± 78.42	<3000	TULSMA

<sup>a</sup> Límite máximo permisible para aguas de consumo humano y uso doméstico, que únicamente requieran tratamiento convencional.

<sup>b</sup> El límite de detección para nitritos fue de 0.002 mgL<sup>-1</sup>. NA: valor no asignado. NE: no establecido. BLD: bajo el límite de detección.

**Anexo 3.** Concentración de bacterias mesófilas aerobias y coliformes totales en los puntos de muestreo A-C.



**Fuente:** Estudio realizado por el equipo de investigación *Hi-Water*. **A:** Díaz L.; **B:** Urresta G; **C:** Tello S.; **D:** Guerra P. Punto D: No es analizado en el presente estudio por su ubicación geográfica (Río Pano, Tena-Archidona).

**Anexo 4.** Amplificación por PCR convencional de ADNg a partir de seis membranas de PES (CPM: 100, 30 y 10 kDa), visualizados en electroforesis en gel de agarosa al 1% en TBE.

