

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA



**Efecto de diferentes concentraciones de *Pseudomonas sp* en la
biorreducción de cromo VI en agua residual de curtiembre de la provincia
de Trujillo, 2017**

PRESENTADO POR

Bach. Miranda Paz, Kathleen Xiomara

**TESIS PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN
BIOTECNOLOGÍA**

**NUEVO CHIMBOTE –PERU
2019**

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA



**Efecto de diferentes concentraciones de *Pseudomonas sp* en la
biorreducción de cromo VI en agua residual de curtiembre de la provincia de
Trujillo, 2017**

**TESIS PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN
BIOTECNOLOGÍA**

TESISTA:

Bach. Miranda Paz, Kathleen Xiomara

Revisado y Aprobado por el Asesor:

.....

Blgo. Mblgo. Villanueva Carlos José Manuel
Docente de la Universidad Nacional del Santa

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA



UNS
UNIVERSIDAD
NACIONAL DEL SANTA

**Efecto de diferentes concentraciones de *Pseudomonas sp* en la
biorreducción de cromo VI en agua residual de curtiembre de la provincia de
Trujillo, 2017**

**TESIS PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN
BIOTECNOLOGÍA**

TESISTA:

Bach. Miranda Paz, Kathleen Xiomara

Revisado y Aprobado por el Jurado Evaluador:

.....
Presidente
M.Sc. Ángel Castro Alvarado

.....
Secretario
Blgo. Mblgo. José Villanueva Carlos

.....
Integrante
Blgo. Mblgo Eterio Alva Muñoz

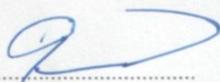
ACTA DE CALIFICACIÓN DE LA SUSTENTACIÓN DE LA TESIS

En el Distrito de Nuevo Chimbote, en la Universidad Nacional de Santa, en el aula Ciencias C-3, siendo las 18:00 horas del día 28-12-2018, dando cumplimiento a la Resolución N° 246-2018-UNS, se reunió el Jurado Evaluador presidido por: M. Sc. Ángel Castro Alvarado, teniendo como miembros a: Blgo. Mblgo. José Villanueva Carlos (secretario) y Blgo Mblgo. Eterio Alva Muñoz. (Integrante), para la sustentación de tesis a fin de optar el título de Licenciado en Biotecnología, realizado por el, (la), (los) tesista (as): Kathleen Xiomara Miranda paz, quien (es) sustentó (aron) la tesis intitulada:

Efecto de diferentes concentraciones de *Pseudomonas sp* en la bioreducción de cromo VI en agua residual de curtiembre de la provincia de Trujillo 2017

Terminada la sustentación, el (la), (los) tesista (as)s respondió (ieron) a las preguntas formuladas por los miembros del jurado.

El Jurado después de deliberar sobre aspectos relacionados con el trabajo, contenido y sustentación del mismo y con las sugerencias pertinentes, declara la sustentación como Bueno asignándole un calificativo diez y seis puntos, según artículo 40° del Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad Nacional del Santa, vigente (Res.471-2002-CU-R-UNS) Siendo las 19:00. horas del mismo día se dio por terminado el acto de sustentación firmando los miembros del Jurado en señal de conformidad



Nombre: M. Sc. Ángel Castro Alvarado
Presidente



Nombre: Blgo. Mblgo. José Villanueva Carlos
secretario



Nombre: Blgo Mblgo. Eterio Alva Muñoz
Integrante

Distribución: Integrantes J.E (), tesis () y archivo (02).

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis Padres, amigos y Profesores que gracias a su esfuerzo yo puedo tener una educación de calidad.

AGRADECIMIENTO

A Dios Padre, por permitirme culminar mi etapa en mi formación académica y seguir obteniendo los grados académicos.

Al colaborador del laboratorio de Microbiología y Bioquímica, Tec. Oscar Ricardo Chauca Quintana por brindarme sus conocimientos y apoyo en la ejecución experimental de mi tesis; al colaborador del laboratorio de Investigación, Bachiller André Alexis Ángeles Angulo por apoyarme en la ejecución de mi tesis. A Smit Mendoza Ramos por apoyarme en la ejecución de mi tesis.

A mis padres que me apoyaron emocionalmente a seguir continuando a desarrollar un buen trabajo.

A mi asesor José Manuel Villanueva Carlos que me guio en un buen camino para desarrollar un mejor trabajo.

Al Profesor Alejandro Padilla Sevillano por su apoyo en la ejecución de mi tesis y asesoramiento para realizar un mejor trabajo.

RESUMEN

El presente trabajo de investigación es de tipo experimental, que tiene por objetivo evaluar el efecto de diferentes concentraciones de *Pseudomonas sp* en la biorreducción de cromo VI en agua residual de curtiembre de la provincia de Trujillo, Perú. La muestra fue obtenida de la curtiembre Chimú ubicada en la provincia de Trujillo donde se permitió el acceso a la recolección de muestra necesaria para el análisis. En el proceso de análisis de la muestra inicial es decir la muestra de cromo sin ningún tratamiento se encontró que tiene un porcentaje de cromo VI de 1.6147 mg/L

Se realizaron tres tratamientos para poder evaluar cuál es el más efectivo en un periodo de 40 horas donde se extraía muestra cada 4 horas, después de analizar las diversas muestras por medio de absorción atómica, se mostraron que el primer tratamiento tiene una concentración de *Pseudomonas sp* de 3×10^8 bact/mL obtuvo una reducción de 0.2486mg/L , el segundo tratamiento posee un concentración de *Pseudomonas sp* de 3×10^6 bact/mL obtuvo una reducción de 0.2327mg/L y el tercer tratamiento posee un concentración de *Pseudomonas sp* de 3×10^4 bact./mL obtuvo una reducción de 0.2326mg/L

Si hubo una reducción, aunque no es exactamente la reducción total, pero eso quiere indicar que el tratamiento más efectivo sería es el primero donde hubo una mayor reducción.

Palabras claves: Cromo, Curtiembre, *Pseudomonas sp*.

Kathleen Xiomara Miranda Paz

ABSTRACT

The present research work is of experimental type, which aims to evaluate the effect of different concentrations of *Pseudomonas* sp in the chromium VI biorreduction in wastewater from tannery in the province of Trujillo, Peru. The sample was obtained from the Chimú tannery located in the province of Trujillo where access to the sample collection necessary for the analysis was allowed. In the process of analyzing the initial sample, that is, the chromium sample without any treatment was found to have a chromium VI percentage of 1.6147 mg / L.

The treatments are published so that they can be used to obtain more information. of 3×10^8 bact / mL obtained a reduction of 0.2486mg / L, the second treatment has a concentration of *Pseudomonas* sp of 3×10^6 bact / mL, a reduction of 0.2327mg / L and the third treatment has a concentration of *Pseudomonas* sp of 3×10^4 bact. / mL obtained a reduction of 0.2326mg / L

If it is a reduction, although it is not exactly the total reduction, it is a greater reduction.

Keywords: Chromium, Tannery, *Pseudomonas* sp.

INDICE

DEDICATORIA	II
AGRADECIMIENTO	III
RESUMEN.....	IV
ABSTRACT.....	V
INDICE	VI
INDICE DE TABLAS	IX
INDICE DE FIGURAS.....	X
INDICE DE ANEXOS.....	XII
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	7
2.1. Objetivo General	7
2.2. Objetivos Específicos	7
III. HIPOTESIS:.....	8
IV. MARCO TEORICO.....	9
4.1. Cromo	9
4.2. <i>Pseudomonas</i>	9
4.2.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11
4.2.2. <i>Pseudomonas fluorescens</i>	12
4.3. MEDIOS DE CULTIVO.....	14
4.3.1. Agar cetrimide	14
4.3.2. Agar <i>Pseudomonas P</i>	15
4.4. Pruebas Bioquímicas.....	15
4.4.1. Agar Citrato de Simmons.....	15
4.4.2. Medio SIM (Sulfhídrico, Indol, Movilidad).....	2
4.4.3. Medio TSI (Triple Azúcar Hierro)	17
4.4.4. Medio LIA (Agar Lisina Hierro).....	18
4.5. El Cromo en el Medio Ambiente	19
4.6. Fabricas de curtiembre	20
4.7. Biorremediación	21
4.7.1. Tipos de biorremediación	22
4.8. Biorreducción	23
4.9. Bioadsorción.....	23
4.9.1. Parámetros que afectan el proceso de bioadsorción	24
4.10. Reduccion del cromo VI a Cromo III	25
V. MATERIALES Y METODOS	26

5.1. Aislamiento e identificación de <i>Pseudomonas sp</i>	26
5.1.1 Recolección de muestra:	26
5.1.2 Preparación de Medio de Cultivo	26
5.1.3 Siembra y Selección de bacteria.....	27
5.1.4 Siembra de bacteria seleccionada	28
5.1.5 Aislamiento de la bacteria.....	29
5.1.6 Cultivo de <i>Pseudomonas sp</i>	29
5.2 Identificación de <i>Pseudomonas sp</i>	30
5.2.1. Pruebas bioquímicas	30
5.2.1.1. Medio citrato de Simmons	30
5.2.1.2. Medio SIM (Sulfuro Indol para movilidad)	30
5.2.1.3. Medio LIA (Lisina Hierro)	30
5.2.1.4. Medio TSI (Hierro triple azúcar)	30
5.2.2. Tinción Gram.....	31
5.3 Sistema de Tratamiento de biorreducción de cromo VI por <i>Pseudomonas sp</i>	32
5.3.1 Acondicionamiento del sistema	32
5.3.2. Elaboración de los tratamientos: <i>Pseudomonas sp</i> a diferentes concentraciones.33	
5.3.2.1. Siembra del cultivo puro	33
5.3.2.2. Preparación de Solución Madre.....	33
5.3.2.3. Composición de los Inóculos	35
5.3.3. Preparación del Sistema de tratamiento.	35
5.3.4. Monitoreo y recolección de resultados del sistema.	36
5.4. Evaluación de resultados de bioadsorción de cromo VI.....	36
5.4.1. Análisis por espectrofotómetro de absorción atómica.	36
5.4.2. Cinética	36
VI. RESULTADOS.....	37
6.1. Identificación de <i>Pseudomonas sp</i>	37
6.1.1. Pruebas Bioquímicas.....	37
6.1.2. Tinción Gram.....	39
6.2. Biorreducción de cromo.....	40
6.3 Prueba Estadística: ANOVA.....	44
6.3.1. Prueba de NORMALIDAD	44
6.3.2. Prueba de Homogeneidad de Varianza	45
6.3.3 ANOVA.....	45
6.4 Cinética	46
VII. DISCUSION:	55

VIII. CONCLUSIONES	60
IX. RECOMENDACIONES	61
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
ANEXOS.....	67

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Soluciones Patrón para el sistema de tratamiento.....	34
Tabla 2. Preparación de tratamientos a utilizar en el proyecto.	35
Tabla 3. Promedio de biorreducción de cromo VI utilizando <i>Pseudomonas sp</i> en concentración de 3×10^8 de <i>Bact/mL</i>	40
Tabla 4. Promedio de biorreducción de cromo VI utilizando <i>Pseudomonas sp</i> en concentración de 3×10^6 de <i>Bact/mL</i>	41
Tabla 5. Promedio de biorreducción de cromo VI utilizando <i>Pseudomonas sp</i> en concentración de 3×10^4 de <i>Bact/mL</i>	43
Tabla 6. Pruebas de Normalidad de los diferentes tratamientos realizados.	44
Tabla 7. Pruebas de Homogeneidad de Varianza.....	45
Tabla 8. Factor ANOVA de los diferentes tratamientos realizados.	46
Tabla 9. Cinética de Biomasa VS Sustrato utilizando <i>Pseudomonas sp</i> en concentración de 3×10^8 de <i>Bact/mL</i> con reducción de cromo.....	47
Tabla 10. Cinética de Biomasa VS Sustrato utilizando <i>Pseudomonas sp</i> en concentración de 3×10^6 de <i>Bact/mL</i> con reducción de cromo.....	48
Tabla 11. Cinética de Biomasa VS Sustrato utilizando <i>Pseudomonas sp</i> en concentración de 3×10^4 de <i>Bact/mL</i> con reducción de cromo.....	50
Tabla 12. Valores de biomasa para hallar la constante especifica de velocidad de crecimiento del tratamiento N° 1 con agua residual de cromo.	51
Tabla 13. Valores de biomasa para hallar la constante especifica de velocidad de crecimiento del tratamiento N° 2 con agua residual de cromo.	52
Tabla 14. Valores de biomasa para hallar la constante especifica de velocidad de crecimiento del tratamiento N° 3 con agua residual de cromo.	53
Tabla 15. Escala Mc Farland	70
Tabla 16. Cantidades para preparación de diluciones para biomasa	77
Tabla 17. Valores de peso seco y absorbancia para curva de biomasa	78
Tabla 18. Cantidades para preparación de diluciones de glucosa.....	80
Tabla 19. Valores de Absorbancia de las distintas concentraciones de glucosa	81

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Características generales del genero <i>Pseudomona</i>	13
Figura 2.- Características Bioquímicas del genero <i>Pseudomona</i>	13
Figura 3. Componentes del medio Agar Cetrimide.....	14
Figura 4. Componentes del medio Agar <i>Pseudomonas</i> P.....	15
Figura 5.- Muestra recolectada de los cuerpos receptores de la curtiembre Chimú	26
Figura 6. Preparación de medio agar <i>Pseudomonas</i>	27
Figura 7. Selección de bacterias.	28
Figura 8. Siembra de <i>Pseudomonas</i> en tubo con caldo común	28
Figura 9. Aislamiento de <i>Pseudomonas</i> en Agar Cetrimide:	29
Figura 10. Conservación de <i>Pseudomonas</i>	29
Figura 11. Preparación de medios para identificación.....	31
Figura 12. Preparación y observación de la lámina para vista en el microscopio	32
Figura 13. Acondicionamiento de Agitador shaker.	33
Figura 14. Comparación de Concentración madre con Tubo de Mc Farland N° 4.....	34
Figura 15. Agitador Shaker con Matraces.	35
Figura 16. Recolección de resultados.	36
Figura 17. Pruebas Bioquímicas para identificación <i>Pseudomonas sp</i> a las 24 horas.	37
Figura 18. Pruebas Bioquímicas a las 48 horas de reacción.....	38
Figura 19. Tinción Gram a 100 x.....	39
Figura 20. Tinción Gram a 40x. Se observa que la muestra es bacteriana se tiñe de color rosado muestra que es negativo característico de la <i>Pseudomonas sp</i>	39
Figura 21: Promedio de biorreducción de cromo VI utilizando una concentración de 3×10^8 bacteria/mL de <i>Pseudomonas sp</i>	41
Figura 22: Promedio de biorreducción de cromo VI utilizando una concentración de 3×10^6 bact/mL de <i>Pseudomonas sp</i>	42
Figura 23: Promedio de biorreducción de cromo VI utilizando una concentración de 3×10^4 bact/mL de <i>Pseudomonas sp</i>	43
Figura 24: Cinética de biomasa, sustrato y producto utilizando una concentración de 3×10^8 bact/mL de <i>Pseudomonas sp</i> con agua residual de cromo.....	47
Figura 25: Cinética de biomasa, sustrato y producto utilizando una concentración de 3×10^6 bact/mL de <i>Pseudomonas sp</i> con agua residual de cromo.....	49
Figura 26: Cinética de biomasa, sustrato y producto utilizando una concentración de 3×10^6 bact/mL de <i>Pseudomonas sp</i> con agua residual de cromo.....	50
Figura 27: Constante de velocidad de crecimiento del tratamiento N° 1 con muestra de agua residual de cromo.....	52

Figura 28: Constante de velocidad de crecimiento del tratamiento N° 2 con muestra de agua residual de cromo.....	53
Figura 29: Constante de velocidad de crecimiento del tratamiento N° 2 con muestra de agua residual de cromo.....	54
Figura 30. Métodos turbidimétrico y recuento en placa	71
Figura 31: Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad de crecimiento bacteriano	75
Figura 32: Curva de Calibración de biomasa	79
Figura 33: Curva de Calibración de Glucosa.....	81

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Nefelómetro de MC Farland	68
Anexo 2: Determinación de Cromo Total.	72
Anexo 3: Modelo de Monod	74
Anexo 4: Determinación de concentraciones para el tratamiento.....	76
Anexo 5: Curva de calibración de biomasa	77
Anexo 6: Curva de calibración de glucosa	80
Anexo 7: Resultados de cromo VI.....	82

I. INTRODUCCIÓN

Las aguas residuales son materiales derivados de la actividad industrial y de los residuos domésticos, los cuales por razones de salud pública no pueden ser vertidos a los cursos de aguas corrientes o lagos. A pesar de las recomendaciones y ordenanzas en los últimos años los ambientes naturales han recibido un creciente aporte de efluentes industriales y domésticos que han llevado al deterioro de muchos cursos de agua haciéndolos incompatibles con la vida. Los efluentes industriales que contienen Cr (VI) son descargados por industrias químicas, de construcción de maquinarias e instrumentos, de radio electrónica, curtiembres, efluentes de torres refrigerantes de estaciones generadoras de energía eléctrica, entre otras. Aun cuando internacionalmente las Concentraciones Máximas permitidas (MAC) en el ambiente son 0,1 mg/L de Cr (VI) y 0,5 mg/L de Cr (III). Las operaciones y procesos de las curtiembres generan líquidos y sólidos que se distinguen por su elevada carga orgánica y presencia de agentes químicos que pueden tener efectos tóxicos, como es el caso del sulfuro y el cromo. Las variaciones en cuanto al volumen de los residuos y a la concentración de la carga contaminante se presentan de acuerdo a la materia prima procesada y a la tecnología empleada (Ramirez, 2002).

El cromo en la etapa de curtido, es uno de los contaminantes, que produce impactos negativos en el crecimiento del país, ya que compromete la salud humana, dañando los procesos ecológicos que sostiene la producción de alimentos, y desde el punto de vista económica la evacuación de residuos tiene un costo elevado para una empresa. Existen referencias sobre el cromo; que indican que es un metal pesado que funciona químicamente con distintas valencias: bivalente, trivalente y hexavalente, siendo este último de gran importancia por su alto poder tóxico. El cromo trivalente y el cromo

hexavalente en particular es un desnaturalizador de proteínas y precipitante de los ácidos nucleicos; además, es considerable la acción cancerígena de los cromatos sobre el pulmón y el aparato digestivo. El envenenamiento agudo por ingestión produce vértigo, sed intensa, dolor abdominal, vómito, choque y oliguria o anuria. La muerte se produce por uremia. La inhalación de vapores de cromo por largos periodos, causa ulceración indolora, hemorragia y perforación del tabique nasal, acompañado de secreción nasal fétida, también se ha observado conjuntivitis, lagrimeo y hepatitis aguda con ictericia. Los datos de laboratorio indican que en personas que sobrepasan el valor máximo permisible hay hematuria y proteinuria y deterioro de la función hepatocelular; así mismo, que el cromo y los cromatos son irritantes y destructores para todas las células del organismo. En las muertes por envenenamiento agudo, se encuentra nefritis hemorrágica (Brossa, 1983).

La biorremediación consiste en recuperar el medio ambiente contaminado mediante la Biotecnología. Existen microorganismos capaces de captar y fijar metales pesados. Otros permiten recuperar un suelo o aguas contaminadas; son muchos los microorganismos que pueden llevar a cabo la reducción de metales como Mercurio (Hg), Plomo (Pb), Arsénico (As), Cadmio (Cd), Cobre (Cu), Cromo (Cr), molibdeno (Mo), plata (Ag), selenio (Se), vanadio (Va), oro (Au), hierro (Fe), manganeso (Mn), Uranio(U), Bismuto (Bi), Teluro (Te), mediante la reducción convierten un alto estado de oxidación del elemento a un estado de oxidación menor ejemplo: Hg (II) a Hg (0) o Cr (VI) a Cr (III). Entre los microorganismos capaces de reducir iones metálicos tenemos una gran variedad de géneros, y las transformaciones las llevan a cabo de acuerdo a su capacidad fisiológica, algunos lo hacen mediante reacciones enzimáticas, mientras que otros lo hacen mediante la excreción de un compuesto reductor que convierte abióticamente el ión de un alto estado de oxidación a uno

menor. Se han investigado intensamente los potenciales de la biorremediación de cromo, Se han estudiado tres modos: La bioadsorción, la reducción enzimática, y la reducción abiótica acoplados. Es ampliamente conocido que las bacterias en cultivo pueden reducir cromatos y dicromatos, estas bacterias están ampliamente y listas para ser aisladas del suelo, sedimentos y aguas contaminadas, se han reportado especies de *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, entre otras con capacidad de reducir el Cr (VI). Tanto aerobios como anaerobios son activos. Los organismos a elegir deben presentar un alto grado de tolerancia. Bajo condiciones adecuadas, se ha logrado 99% de reducción de Cr (VI), pero a concentraciones muy altas del ión, el porcentaje de reducción disminuye (Alexander, 1999).

Entre los estudios que sustentan la presente investigación se encontraron las siguientes investigaciones a nivel internacional:

En Argentina, El estudio “Efecto de Factores Físicos y Químicos sobre la Remediación de Residuos Sólidos Contaminados con Cr(VI) por *Aspergillus niger*. Mecanismo de Detoxificación” concluyo que *Aspergillus niger* se usó para estudiar la remediación de pulpa de limón contaminada variando la concentración de Cr(VI), la temperatura y la concentración de conidios. La toxicidad del Cr(VI) sobre el desarrollo del hongo y la producción de poligalacturonasas (EC.3.2.1.15); naringinasa (2- L-ramnosidasa, EC.3.2.1.40 y 2-D-glucosidasa, EC.3.2.1.21) y reductasa fue también evaluada. Usando fermentación en estado sólido el hongo, remedió el 100% de la pulpa (80%humedad) contaminada con Cr(VI) a 5, 10 y 20 mg/L y alcanzó un 99% de eficiencia, cuando la concentración del metal pesado fue 50 mg/L en las siguientes condiciones: 2.105 conidios/g de pulpa; 30 °C y pH 2.5. El Cr(VI) influyó en la

maduración de los conidios del hongo (48 h), disminuyó la concentración de proteína intracelular (0.22 mg/mL) reflejada por la ausencia de bandas proteicas de una PAGE-no desnaturalizante y redujo un 24 y 86%, la producción de poligalacturonasa (PG) y naringinasa (N), respecto al control (72 h; proteína: 0.25 mg/mL; PG: 0.17 y N: 0.02 U/ml). Se determinó actividad específica cromato reductasa ($6.3 \cdot 10^{-2}$ U/mg) y por absorción atómica se verificó que el 97.30% del Cr(VI) se redujo a Cr(III). Se propone que el mecanismo de detoxificación de Cr(VI) por *A. Niger* es por adsorción del metal a la pared celular y absorción al interior celular. La biorremediación puede suplementar a los tratamientos físicos químicos ya existentes o aquellos que no resultan completamente eficientes, para alcanzar una verdadera remediación. (Argentina, 2015)

En Argentina, En una investigación de “Remediación de Iones Cr(VI) en Soluciones Acuosa por *Aspergillus niger* BM-56”; concluyo que en las concentraciones de Cr (VI) examinadas se obtuvo una eficiencia de remoción del 100%. La variación del pH del medio no afectó el desarrollo del hongo ni la biorremediación del metal. A pH 5.5 (± 0.2) se obtuvo la máxima remoción de Cr (VI) mientras que a pH 2.5 (± 0.2) y 4.5 (± 0.2) disminuyó un 2 a 4 % respecto al máximo. Se propone que *Aspergillus niger* BM-56 detoxifica soluciones acuosas que contienen Cr (VI) mediante un proceso de reducción de este metal a Cr (III). En este proceso de transformación se obtiene una masa celular menos tóxica, la cual puede ser utilizada, en procesos fermentativos para la producción de un metabolito de importancia industrial. (Duca, Nuñez, Navarro, & Rubio, 2003).

En Colombia, “Medición de la capacidad de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus* para la remoción de cromo de aguas de curtiembre”; concluyo

que en el presente proyecto se investiga los aspectos referentes al proceso biológico de adsorción del metal en fase acuosa mediante dos tipos de microalga verde nativa, denominadas *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus*. La caracterización del proceso de adsorción biológica de cromo trivalente se realizó en agua sintética y agua residual procedente de un proceso de curtido del sector de San Benito, en el sur de Bogotá. El proceso de bioadsorción también se llevó a cabo con alga libre y alga inmovilizada en alcohol polivinílico y se determinaron la cinética y el equilibrio de adsorción para establecer las posibles diferencias en la remoción del metal pesado presente en diferentes tipos de agua y de estado del agente bioadsorbente, para finalmente determinar si el proceso de bioadsorción es una alternativa competitiva frente a otros procesos de remoción de cromo y de otros metales pesados como los procesos de precipitación química y adsorción (Forero, 2012).

En el ámbito nacional se encontraron los siguientes trabajos de investigación:

En Lima; Un estudio de “Biorremediación de cromo VI de aguas residuales de curtiembres por *Pseudomonas sp* y su efecto sobre el ciclo celular de *Allium cepa*”, llegó a la conclusión que *Pseudomonas sp*, no lleva a cabo una reducción significativa de cromo VI, pues solo lo reduce en un 13,51%, con una velocidad de reducción de $4,16 \times 10$ ppm/h, mientras el cromo total alcanza una reducción considerable a las 24 horas pasando de 2460 a 340 ppm. Con una velocidad de reducción de 89.166 ppm/h. Se observa que en este mismo tiempo de tratamiento la población bacteriana alcanza su fase logarítmica, alcanzando una velocidad de crecimiento de 0,198/h y que la población empieza a disminuir a partir de las 24 horas, después de las 24 horas no hay reducción de cromo total en cantidades apreciables. Al determinar el efecto sobre el ciclo celular de *Allium cepa* se observa que se produce daño celular en todas las concentraciones por lo que se concluye que no se alcanza un nivel de

reducción suficiente para evitar el daño celular y para ser aceptable según las normas de saneamiento de aguas residuales. (Otiniano Garcia, Collantes, & Lurdes, 2007)

En Lima; “Estudio de la bioadsorción de cromo (VI) con quitosano cuaternario reticulado para su aplicación en biorremediación de aguas contaminadas”, concluyo que el uso de quitosano cuaternario entrecruzado, QC2, en la remoción de ion cromo (VI) a partir de soluciones acuosas a temperatura ambiente, mediante experimentos de adsorción discontinuos. Los parámetros que se ha evaluado en la capacidad de adsorción del ion mencionado, el adsorbente, fueron efecto de: pH, masa de adsorbente, concentración del ion, cinética de adsorción y fuerza iónica, apoyados por los análisis FTIR, SEM, TGA. Los resultados se han analizado usando los modelos matemáticos de Langmuir y Freundlich; los resultados muestran que la adsorción se da mediante un mecanismo mixto. Los parámetros calculados demuestran una alta afinidad adsorbente/adsorbato para QC2 con una máxima capacidad de adsorción de $208,3 \text{ mg g}^{-1}$, elucidando el potencial uso de este adsorbente para la remoción de ion cromo (VI) en soluciones acuosas, mediante una cinética de pseudosegundo orden con una constante de velocidad de $0,289 \text{ g mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$. La desorción es eficiente en una mezcla NaCl / NaOH (1,0 M) con 99,78 % de remoción a pH 4,5. Altas concentraciones de fuerza iónica afectan la capacidad de adsorción de cromo (VI) (Díaz, Jacinto, Medina, Navarro, & Llanos, 2013).

En el ámbito local no se encontró trabajos de investigación relacionados a este tema; es por eso una de las razones que se ha descrito que me motivo a realizar el presente estudio de investigación formulando la siguiente interrogante:

¿Cuál es el efecto de diferentes concentraciones de *Pseudomonas sp* en la biorreducción de cromo VI en agua residual de curtiembre de la provincia de Trujillo, 2017?

II. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de *Pseudomonas sp* en la biorreducción de cromo VI en agua residual de curtiembre de la provincia de Trujillo, Perú.

2.2. Objetivos Específicos

- Determinar los niveles presentes de cromo de agua de curtiembre en la provincia de Trujillo por análisis espectrofotométrico.
- Aislamiento y selección de *Pseudomonas sp* del agua residual de curtiembre de la provincia de Trujillo.
- Determinar el efecto de *Pseudomonas sp* a diferentes concentraciones en la biorreducción de cromo VI de aguas residuales de curtiembre suplementado con glucosa.
- Determinar la biorreducción de cromo VI por diferentes concentraciones de *Pseudomonas sp* en escala laboratorio en cultivo por lotes por un periodo de 40 horas.

- Realizar la cinética de biorreducción de cromo VI a diferentes concentraciones de *Pseudomonas sp.* en presencia de cromo.

III. HIPOTESIS:

Se plantea las siguientes hipótesis de investigación:

Si se emplea las concentraciones de *Pseudomonas sp* de 3×10^8 , 3×10^6 , 3×10^4 bact/mL en una muestra de agua residual con cromo VI. En la concentración de 3×10^6 bact/mL se logrará la mayor biorreducción de cromo.

Si la biorreducción de cromo en el agua residual de curtiembres, tiene una biorreducción efectividad significativa, en las concentraciones de 3×10^8 , 3×10^4 bact/mL en la reducción del porcentaje de cromo VI.

IV. MARCO TEORICO

4.1. Cromo

El cromo es un elemento metálico en la tabla periódica. No tiene olor ni sabor. El cromo se encuentra en rocas, plantas, suelos, y el polvo volcánico, los humanos y animales. El cromo se manifiesta en el medio ambiente más comúnmente como el trivalente (cromo (III)), hexavalente (cromo-(VI) y en la forma metálica (cromo (0)). El cromo III ocurre naturalmente en muchos vegetales, frutas, carnes, granos y levadura en un rango permisible de 0.05 mg/m³. El cromo (VI) y el cromo (0) son generalmente producidos mediante procesos industriales. Las fuentes principales del cromo (VI) en el agua potable son descargas de fábricas de acero y celulosa, y la erosión de depósitos naturales de cromo (III). En muchos lugares, los compuestos de cromo han sido diseminados al medio ambiente mediante filtraciones, pobre almacenaje, o prácticas inadecuadas de disposición. Los compuestos de cromo son muy persistentes en el agua como sedimentos.

Existen referencias sobre el cromo; que indican que es un metal pesado que reacciona químicamente con valencias II, III y VI (Cr^{2+} , Cr^{3+} , Cr^{6+}) siendo este último de gran poder tóxico y el más difícil de oxidar o eliminar de los organismos vivos. El cromo III y el cromo VI o cromo hexavalente, en particular son desnaturalizadores de proteínas y precipitan ácidos nucleicos; además son de acción cancerígena sobre los pulmones y el aparato digestivo. (Otiniano Garcia, Collantes, & Lurdes, 2007)

El cromo hexavalente es uno de los contaminantes, que produce mayores impactos negativos en el crecimiento del país, ya que compromete la salud humana, dañando los procesos ecológicos que sostiene la producción de alimentos (Garcia, 1993)

4.2. *Pseudomonas*

Son bacterias mesofilas, sobreviven en temperaturas de 4 - 42°C que pueden llegar a utilizar más de 100 componentes distintos como fuente de carbono, pero éstos deben ser siempre compuestos orgánicos de bajo peso molecular, ya que estas bacterias carecen de las enzimas hidrolíticas necesarias para llevar a cabo la degradación de polímeros. Las características mínimas con las cuales pueden ser identificadas son el metabolismo oxidativo que presentan, la movilidad, oxidasa casi siempre positiva, en

medio OF con glucosa produce ácido (color amarillo) y no genera gas y son indol negativas (Pérez S. G., 2017). *Pseudomonas* son microorganismos móviles, debido a la presencia de uno o más flagelos polares. Algunas especies sintetizan una capa de exopolisacáridos que facilita la adhesión celular, formación de biopelículas o biofilms, y protege de la fagocitosis, de los anticuerpos o complementos, aumentando así su patogenicidad. (Díaz, 2011) Se encuentran normalmente en el suelo, aunque también pueden ser patógenos oportunistas en animales (*P. aeruginosa*, *P. fluorescens*) y patógenos de plantas (*P. syringae*). Algunas bacterias de este grupo producen pigmentos fluorescentes de colores amarillo verdoso, fácilmente solubles en agua. (Jean Marie Meyer, 2002)

Pseudomonas son quimiorganotrofos, aunque algunas crecen quilitotroficamente de forma facultativa. El género *Pseudomonas* estratifica al prototipo de la familia y se caracteriza por los siguientes distintivos de la familia. Desde el punto de vista fisiológico y metabólico los *Pseudomonas* se caracterizan por el amplio espectro de nutrientes orgánicos utilizables. También utilizan un gran número de compuestos heterocíclicos y aromáticos, que no son atacados por otras bacterias. Los azúcares se degradan generalmente por la vía de Entner-Doudoroff. Algunas especies de *Pseudomonas* oxidan los azúcares de forma incompleta y excretan los ácidos correspondientes (Martínez L. C., 2012).

Las bacterias del género *Pseudomonas* son un grupo heterogéneo de bacterias gramnegativas que tienen en común la incapacidad para fermentar lactosa. En el pasado, clasificados dentro del género *Pseudomonas*, los miembros de este grupo se han asignado ahora a tres géneros importantes desde el punto de vista médico (*Pseudomonas*, *Burkholderia* y *Stenotrophomonas*), cuyos comportamientos biológicos comprenden similitudes y diferencias notorias, con repertorios genéticos que difieren en muchos aspectos. (Ramphal, 2016).

El género *Pseudomonas* es bien conocido por su versatilidad metabólica y plasticidad genética. Las especies de *Pseudomonas*, en general, crecen rápidamente y presentan gran habilidad para metabolizar una amplia variedad de sustratos, incluyendo compuestos orgánicos tóxicos, como hidrocarburos alifáticos y aromáticos. Las cepas de las especies de *Pseudomonas* son frecuentemente resistentes antibióticas, desinfectantes, detergentes, metales pesados y solventes orgánicos. Este género puede vivir en numerosos hábitats, que van desde diversos tipos de ambientes acuáticos y terrestres, hasta tejidos diversos de animales, incluyendo frutas

y verduras, por lo tanto, el hábitat primario es ambiental. También se encuentran en suelos y aguas que presentan condiciones aeróbicas, mesofilas y pH neutro (Martínez L. R., 2007)

Existen numerosas especies, sin embargo, las que con mayor frecuencia se aíslan de muestras clínicas son: *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri*. Las tres primeras especies se caracterizan por producir pigmento fluorescente verde limón. *Pseudomonas stutzeri* generalmente presenta cultivos de aspecto seco y rugoso.

4.2.1. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa pertenece a la familia *Pseudomonaceae*. Se trata de un bacilo recto o ligeramente curvado Gram negativo, con un tamaño de $2^{-4} \times 0,5^{-1} \mu\text{m}$, y móvil gracias a la presencia de un flagelo polar. En relación con su metabolismo, es aerobio (aunque puede desarrollarse en condiciones anaerobias utilizando nitrato), catalasa positiva y oxidasa positiva. Se caracteriza por producir una variedad de pigmentos, como la piocianina (de color azul verdoso), la pioverdina (pigmento fluorescente de color verde amarillento) y la piorrubina (de color rojo). (Hernández & Lorén, 2017). La mayoría de células de *P. aeruginosa* presentan un único flagelo polar, aunque en algunas ocasiones se han observado algunos aislados con dos o tres flagelos. (Martínez L. R., 2007)

P. aeruginosa tiene importancia para el hombre tanto porque le representa problemas, como porque puede ser útil en el tratamiento de la contaminación ambiental. Contrariamente a lo que parece, todos nosotros estamos en contacto diariamente con *P. aeruginosa*, ya que se encuentra en bajas cantidades en nuestros alimentos y en algunos artículos de limpieza. (Chávez, 2010). Representa un problema importante de salud en centros hospitalarios, especialmente cuando se trata de pacientes con cáncer o quemados. Una vez que se establece la infección, el microorganismo produce una serie de compuestos tóxicos que causan no sólo daño tisular extenso, sino adicionalmente interfieren con el funcionamiento del sistema inmune.

Pseudomonas aeruginosa es causa frecuente de infecciones asociadas al cuidado de la salud, principalmente en pacientes inmunosuprimidos, quemados, personas con

fibrosis quística y usuarios de unidades de cuidados intensivos (UCI); comúnmente presenta resistencia a varias clases de antibacterianos dificultando el tratamiento y asociándose a tasas mayores de mortalidad e incrementos en el costo de la atención hospitalaria (Giraldo, 2014)

4.2.2. *Pseudomonas fluorescens*

Las bacterias *P. fluorescens* son organismos aerobios quimioorganotróficos, es decir, que su metabolismo se basa en reacciones de óxido-reducción para obtener energía, utilizando sustancias oxidables a pH neutro o básico. Su diámetro varía entre 0,5 y 0,8 µm (O.P Shukla, April - 2006). Las *Pseudomonas fluorescens* secretan un tipo de sideróforo denominado pioverdina y es responsable de la fluorescencia de las cepas bajo la luz así mismo pueden promover el crecimiento de las plantas directamente mediante el aporte de nutrientes o de hormonas del crecimiento. Generalmente son aerobias no fermentativas y móviles, las cuales presentan un flagelo polar (Leon, 2014).

P. fluorescens ha sido frecuentemente identificada como microorganismo contaminante de la piel humana y como agente causante de bacteremia (presencia de bacterias en sangre) e infecciones en pacientes hospitalizados. Esta especie de *Pseudomonas* también ha sido aislada de pacientes que presentaban infecciones complicadas del tracto urinario. Asimismo, cabe mencionar su presencia en biofilms desarrollados en diversos sistemas industriales, como así también su potencial riesgo para causar serios problemas en términos del proceso y la seguridad del producto final en la industria alimenticia. En los procesos industriales de alimentos perecederos diarios, *P. fluorescens* es uno de los microorganismos psicotróficos más comúnmente aislados y además domina la microflora de la leche cruda o pasteurizada en el momento de su deterioro. Recientemente, algunos estudios han demostrado que algunas cepas de *Pseudomonas*, entre ellas *P. fluorescens*, pueden incrementar la colonización de superficies por parte del microorganismo patógeno *Listeria monocytogenes* y/o proteger a esta bacteria de la acción de los desinfectantes. (O.P Shukla, April - 2006)

Characteristics	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. chlororaphis</i> subsp. <i>chlororaphis</i>	<i>P. chlororaphis</i> subsp. <i>aurofaciens</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. fluorescens</i> bv. I	<i>P. fluorescens</i> bv. II	<i>P. fluorescens</i> bv. III	<i>P. fluorescens</i> bv. IV	<i>P. fluorescens</i> bv. V	<i>P. lundensis</i>	<i>P. montelii</i>	<i>P. putida</i> biovar A	<i>P. putida</i> biovar B	<i>P. rhodesiae</i>	<i>P. veronii</i>
Number of flagella	1	>1	>1	1	>1	>1	>1	>1	>1	1		>1	>1	1	1
Nonfluorescent pigment, color:															
Green	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Orange	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Yellow	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Blue	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Gelatin liquefaction	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
Denitrification	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Levan formation	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-
Lecithinase	-	+	+	-	+	d	+	d	d	-	-	-	-	+	-
Lipase	+	+	+	-	+	d	d	d	d	-	-	-	-	-	-
Growth at 4°C	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	d	+	+	+
Growth at 41°C	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Mol% G + C of the DNA	67	63	64	63	60	60	60	60	60	60	60	62	61	59	61

*For symbols see standard definitions. Data from Palleroni (1984), Molin et al. (1986), Hildebrand et al. (1994), Elomari et al. (1996, 1997), and Coroler et al. (1996).

Figura 1.- Características generales del género *Pseudomonas*. Se observa las diferentes características que tienen las especies de *Pseudomonas*.

Fuente: (Garrity, 2005)

	<i>Ps. aeruginosa</i>	<i>Ps. fluorescens</i>	<i>Ps. putida</i>	<i>Ps. stutzeri</i>
Catalasa	+	+	+	+
Oxidasa	+	+	+	+
O/F Glucosa	Ox	Ox	Ox	Ox
OF/ Lactosa	K	K	K	K
O/F Maltosa	K	K	K	A
O/F Xilosa	A	A	A	A
O/F Manitol	A	A	K	A
Piocianina	+	-	-	-
Pioverdina	+	+	+	-
Movilidad	+	+	+	+
Nitrato	+	-	-	+
ADH	+	+	+	-
Fluorescencia	+	+	+	-
Denitrificación	+	-	-	+
Gelatina	+	+	-	-
NaCl 6,5%	+/-	-	-	+
Almidón	-	-	-	+
Colonias rugosas	-	-	-	+
Nº flagelos	1 polar	>1 polar	> 1 polar	1 polar
Desarrollo a 42°C	+	-	-	V

Figura 2.- Características Bioquímicas del género *Pseudomonas*

Fuente: (Helguero, 2009)

4.3. MEDIOS DE CULTIVO.

Los medios de cultivo selectivos para el aislamiento de la bacteria *Pseudomonas sp*:

4.3.1. Agar cetrimide

Medio de cultivo selectivo para el aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa* a partir de diversas muestras.

La cetrimida (Bromuro de cetiltrimetilamonio) inhibe el crecimiento de las bacterias debido a su acción como un compuesto cuaternario de amonio. La base de agar cetrimida promueve la producción de piocianina y fluoresceína que se observan con luz ultravioleta en los cultivos de *Pseudomonas aeruginosa*, lo que puede considerarse como prueba presuntiva para su identificación. (González, Cabezas, & Anguita, 2012) La cetrimida es un detergente catiónico que actúa como agente inhibidor, libera el nitrógeno y el fósforo de las células de casi toda la flora acompañante. (Britania L. , 2018)

FÓRMULA	
PEPTONA DE GELATINA	20.0 g
CLORURO DE MAGNESIO.....	1.4 g
SULFATO DE POTASIO.....	10.0 g
AGAR.....	13.6 g
CETRIMIDA.....	0.3 g
GLICERINA.....	10 ml
AGUA PURIFICADA.....	1000 ml
pH FINAL: 7.2 ± 0.2	

Figura 3. Componentes del medio Agar Cetrimide

Las colonias *aeruginosa* producen un pigmento amarillo verdoso. (piocianina) y fluorescencia bajo luz UV. (Merck, Pseudomonas Selective Agar Base (Cetrimide Agar), 2005)

4.3.2. Agar *Pseudomonas* P

Medio de cultivo utilizado para el aislamiento, la detección y la diferenciación de especies de *Pseudomonas* en base a la producción de piocianina. Conocido también como medio King A. (Britania L. , 2018)

Pseudomonas Agar P favorece la formación de piocianina y Piorubina y reduce la de fluoresceína, mientras que *Pseudomonas* Agar F estimula la producción de fluoresceína y reduce esa cantidad de piocianina y / o piorubina. Los medios de cultivo permiten una identificación rápida y preliminar de la mayoría. Especies de *Pseudomonas*, ya que algunas cepas solo pueden sintetizar piocianina, algunas forman solo fluoresceína y otras producen ambos pigmentos. (Merck, *Pseudomonas* Agar P, 2005)

FÓRMULA (en gramos por litro)	
PEPTONA DE GELATINA.....	20.0
SULFATO DE POTASIO.....	10.0
CLORURO DE MAGNESIO.....	1.4
AGAR.....	15.0
pH FINAL: 7.2 ± 0.2	

Figura 4. Componentes del medio Agar *Pseudomonas* P

Un resultado positivo es por observación de los pigmentos piocianina y / o Piorrubina. La producción de piocianina se observa como una zona de color azul, azul- verdoso que rodea la colonia, o que se extiendes en todo el medio de cultivo debido a la difusión del pigmento. La producción de piorrubina se observa como una zona de color rojo alrededor de la colonia o que se extiende en todo el medio de cultivo a la difusión del pigmento. (Britania L. , 2018)

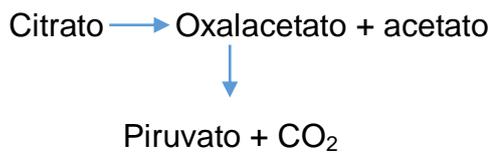
4.4. Pruebas Bioquímicas

4.4.1. Agar Citrato de Simmons

Determina si un microorganismo es capaz de utilizar citrato como única fuente de carbono para el metabolismo y crecimiento, provocando alcalinidad. El medio incluye

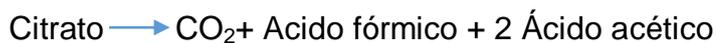
citrato de sodio, un anión como única fuente de carbono y fosfato de amonio como única fuente de nitrógeno.

Normalmente el metabolismo del citrato comprende una condensación de acetilo con la coenzima A y oxalacetato para entrar en el ciclo de Krebs. El desdoblamiento del citrato comprende un sistema enzimático sin la intervención de la coenzima A. Esta enzima se denomina Citritasa o Citrato desmolasa (Lira, Meléndez, & Sandoval, 2003) Como se observa en la siguiente reacción:



Los productos obtenidos del metabolismo del citrato dependen del pH del medio:

pH básico:



pH ácido:



Los ácidos orgánicos son posteriormente utilizados dando como producto final carbonatos y bicarbonatos alcalinos. El pH alcalino así logrado hace que el indicador de pH en el medio, el azul de bromotimol vire de su color verde original a un azul intenso. (Arronte, 2009). El Agar Citrato de Simmons es una modificación del medio de Koser, con la adición de azul de bromotimol y un 1,5% de agar. Los organismos capaces de metabolizar el citrato crecen exuberantemente. El medio se alcaliniza y cambia de verde a azul intenso en 24 a 48 horas. (Neogen, 2017)

Microorganismos Positivos:

Especies de:

- *Salmonella*
- *Arizona*
- *Citrobacter*
- *Enterobacter*

- *Klebsiella*
- *Serratia Licuefaciens*
- *Pseudomonas cepacia*

Microorganismos Negativos

- *Edwarisella*
- *Yersinia enterocolitica*
- *Escherichia coli*
- *Shigella*
- *Yersinica pseudotuberculosis*
- *Otras especies de Moraxella*
- *Proteus morgani*

4.4.2. Medio SIM (Sulfhídrico, Indol, Movilidad)

El medio SIM se emplea para detectar la producción de sulfuro, la formación de indol y la motilidad. Sulfato de amonio ferrosos y tiosulfato de sodio son los componentes de este medio y al actuar en conjunto sirven como indicadores de la producción de H₂S al formar un precipitado de color negro (Bastidas, 2016)

- Prueba de ácido sulfhídrico: Algunas especies bacterianas son capaces de liberar azufre enzimáticamente de los diferentes aminoácidos que las contienen produciendo el gas ácido sulfhídrico (H₂S). La petona, cisteína y tiosulfato, todos son fuentes de azufre, pero las diferentes especies utilizan distintos compuestos o aminoácidos que contienen azufre para producir H₂S. La enzima responsable de esta etapa es la cisteína. (Lira, Meléndez, & Sandoval, 2003)

Bacteria (medio ácido) + tiosulfato de sodio → gas H₂S

SH₂ + iones férricos → sulfuro ferroso

- Prueba de la producción de indol

La formación de indol se produce solamente en aquellos organismos capaces de fermentar hidratos de carbono, la elevada acidez producida por la fermentación de la glucosa puede impedir el crecimiento del organismo o inhibir la enzima.

Las enzimas triptofanasas oxidan el triptófano para formar tres metabolitos: indol, metil indol y ácido indolacético. Los reactivos de Erhlich o Kovacs contienen DMABA

que reacciona con el indol producido formando un compuesto quinónico color violeta, que se observa por la aparición de un anillo en la superficie del medio (Radillo, 2013)

- Movilidad

Determina si un organismo es móvil o inmóvil. Las bacterias tienen movilidad por medio de sus flagelos que se encuentran principalmente entre los bacilos; sin embargo, algunas formas de cocos son inmóviles. Las bacterias móviles pueden contener un solo flagelo o mucho. (Lira, Meléndez, & Sandoval, 2003). El medio de cultivo tiene consistencia semisólida por lo que la movilidad se observa por el crecimiento del microorganismo en todo el tubo más allá de la zona de inoculación (picadura) y los microorganismos inmóviles solo crecerán en la zona inoculada.

4.4.3. Medio TSI (Triple Azúcar Hierro)

El agar TSI es uno de los más usados para ver la fermentación de carbohidratos en la familia enterobacteriacea (Arronte, 2009). El TSI identifica a las bacterias en función de la fermentación de lactosa, glucosa y sacarosa, y en la producción de sulfuro de hidrógeno; dado que el TSI contiene glucosa (0,1%), sacarosa (1%) y lactosa (1%) (Bastidas, 2016). Determina la capacidad de un organismo de atacar un hidrato de carbono específico incorporado en un medio de crecimiento básico, con producción o no de gases, junto con la determinación de posible ácido sulfhídrico. (Lira, Meléndez, & Sandoval, 2003)

La lactosa, sacarosa y glucosa son hidratos de carbono fermentables. El tiosulfato de sodio es el sustrato necesario para la producción de ácido sulfhídrico, el sulfato de hierro y amonio es la fuente de iones de Fe^{3+} , los cuales se combinan con el ácido sulfhídrico y producen sulfuro de hierro, de color negro. Por fermentación de azúcares, se producen ácidos, que detectan por medio del indicador de rojo de fenol, el cual vira al color amarillo en medio ácido. El tiosulfato de sodio se reduce a sulfuro de hidrogeno que reacciona luego con una sal de hierro proporcionando el típico sulfuro de hierro de color negro. (Britania L. , 2018)

- Pico de flauta alcalino / Profundidad alcalina (K/K). - Microorganismos que no fermentación de hidratos de carbono presentes (glucosa, lactosa y sacarosa). Solo

utilizándolas aeróbicamente daría una superficie alcalina (roja) sobre un fondo alcalino (rojo) Característico de bacterias no fermentadoras como *Pseudomonas aeruginosa*.

- Pico de flauta alcalino / profundidad ácida (K/A). - Los microorganismos que fermenten solo glucosa y no fermentan provocan una reacción alcalina en la superficie (roja) sobre un fondo ácido (amarillo). Característico de bacterias no fermentadoras de lactosa como especies de *Shigella*.

- Pico de flauta alcalino / profundidad ácida (negra) (K/A H₂S). - Glucosa fermentada, lactosa no fermentada; producción de H₂S como: *Salmonella*, *Arizona*, *Citrobacter* y algunas especies de *Proteus*.

- Pico de flauta ácido / profundidad ácida (A/A). - Algunos microorganismos tienen la facultad de fermentar glucosa y lactosa resultando una reacción ácida (amarilla) y ácida en el fondo (amarillo). Característicos de coliformes que fermentan lactosa como *E. coli* y grupo *Klebsiella- Enterobacter*

4.4.4. Medio LIA (Agar Lisina Hierro)

Algunos microorganismos son capaces de provocar la descarboxilación de los aminoácidos por inducción de enzimas específicas, el resultado de esta descarboxilación es la producción de una amina (o diamina) y dióxido de carbono. Tal es el caso de la producción de la enzima lisina descarboxilasa la cual al actuar sobre la lisina produce una diamina llamada cadaverina. (Arronte, 2009) La descarboxilación es el proceso mediante el cual las bacterias que poseen enzimas descarboxilasas específicas son capaces de atacar a los aminoácidos en su grupo carboxilo dando o una amina o una diamina y anhídrido carbónico. El proceso de descarboxilación es irreversible, no oxidativo y requiere una coenzima común, el fosfato de piridoxal. El aminoácido L- lisina sufre la descaboxilación para dar cadaverina y CO₂ por acción de la enzima específica lisina descarboxilasa (Lira, Meléndez, & Sandoval, 2003)

Los aminoácidos al perder el grupo carboxilo se convierten en diaminas lo que incrementa el pH del medio y el indicador (púrpura del bromocresol) vira a violeta. (Radillo, 2013). Un cambio del color original del medio (morado) hacia amarillo en el fondo indica una reacción ácida por la fermentación de una pequeña cantidad de glucosa en el medio. Si el microorganismo produce lisina descarboxilasa, la acción de

esta enzima sobre la lisina dará lugar a la cadaverina, la cual provocará un cambio de pH hacia la alcalinidad dando un color morado que sobrepasa la acidez debida a la glucosa. Así pues, un fondo amarillo indica que no se produce lisina descarboxilasa y un color morado que si es producida. (Arronte, 2009)

4.5. El Cromo en el Medio Ambiente

El cromo se encuentra, relativamente inerte como Cr(III) en las fases sólidas, y se libera al medio acuático en cantidades limitadas por acciones climáticas y de erosión. Las emisiones atmosféricas de cromo a partir de fuentes naturales vienen derivadas del elemento en suspensión, ya que el polvo transportado por el viento es la principal fuente natural de cromo en la atmósfera de la Tierra. La erosión eólica de los suelos puede ser una fuente natural importante de aire con cromo.

Aunque la mayoría de cromo liberado de fuentes naturales es, probablemente, en la forma trivalente, tanto el Cr(III) como el Cr(VI) pueden estar presente en los desechos antropogénicos liberados al medio ambiente.

En presencia de materia orgánica, el Cr (VI) presente en aguas y suelos es reducido a Cr (III); sin embargo, altas concentraciones del ión en estado hexavalente pueden sobrepasar esta capacidad de reducción, lo que impediría su adecuada eliminación

Se estima que cada país desarrollado puede liberar alrededor de 84 toneladas anuales de cromo (incluyendo tanto las formas tri cromo hexavalente) a la atmósfera provenientes de fuentes antropogénicas. De ellas, aproximadamente un 54% son atribuibles a la combustión de elementos fósiles, un 29% para diversos procesos industriales (producción de hierro y acero, procesamiento de refractarios y productos químicos, etc.), y un 12% a actividades relacionadas con el transporte, tales como la combustión de vehículos de motor. Las fuentes secundarias incluyen el desgaste de los neumáticos y pastillas de freno, uso de convertidores catalíticos de automóviles basados en cromo, o la liberación de polvo cromado utilizado en los toners de fotocopiadoras

En el Perú y el mundo se han realizado estudios sobre el cromo en los seres vivos y en el agua, por lo que, aquí citaremos algunos antecedentes relacionados con el cromo en la vida del hombre y en el agua que consume.

A pesar de las recomendaciones y ordenanzas hechas por parte de las autoridades y entidades ambientales, en los últimos años los ambientes naturales han recibido un creciente aporte de efluentes industriales y domésticos que han llevado al deterioro de muchos cursos de agua haciéndolos incompatibles con la vida. Los efluentes industriales que contienen cromo hexavalente son descargados por industrias químicas, principalmente por las curtiembres. Aun cuando los Límites Máximos Permisibles (LMP) para descargas de efluentes líquidos de actividades Minero-Metalúrgica para el cromo hexavalente es de 0.10 mg/L, D.S. N° 010-2010-MINAM y según el Reglamento de la Calidad de Agua para Consumo Humano, D.S. N° 031-2010-SA., para el cromo total es de 0,05 mg/L. (MINAM, 2008)

Los efluentes industriales que contienen Cr (VI) son descargados por industrias químicas, de construcción de maquinarias e instrumentos, de radio electrónica, curtiembres, efluentes de torres refrigerantes de estaciones generadoras de energía eléctrica, entre otras. La concentración de Cr (VI) varía en los efluentes desde docenas a cientos de gramos o miligramos, la cantidad de aguas contaminadas con cromo que se vierten al ambiente varía de docenas a cientos de metros cúbicos por hora. Aun cuando internacionalmente las Concentraciones Máximas permitidas (MAC) en el ambiente son 0,1 mg/L de Cr (VI) y 0,5 mg/L de Cr (III).

4.6. FABRICAS DE CURTIEMBRE

Las fábricas formales de curtiembre han aumentado su tasa de producción, aun así hay fábricas informales donde sus desechos son reducidos por las tuberías de alcantarillado esto causa que vaya en aumento la tasa de cromo hexavalente que es el contaminante principal en la fabricación de pieles y cueros

En Trujillo, específicamente en los distritos de La esperanza, Porvenir, Florencia de Mora, Moche y Salaverry, la industria del curtido de cueros, es la industria de mayor auge, la misma que se da mayormente de manera informal. Industria que ha alcanzado en la actualidad un gran desarrollo con el uso de la tecnología moderna, prueba de ello es la obtención de productos de óptima calidad, juntamente con ello se han presentado nuevos problemas como la contaminación ambiental. (Ibañez, 1997)

Trujillo, es el segundo productor de pieles y cueros después de Lima, contando con 122 curtiembres formales, distribuidas de siguiente manera: distrito de Trujillo 17.21%,

Porvenir 24.59%, Florencia de Mora 8.20%, La Esperanza 46.72% Laredo 0.82% y Moche 2.46%. La curtiembre “Los Lideres S.A” como otras curtiembres de Trujillo, para cumplir con la demanda de cuero, importa materia prima de Ecuador por lo que el proceso de curtido, implica una mayor descarga diaria de soluciones residuales al sistema de alcantarillado. En Arequipa existen reportes de concentración elevadas de cromo hexavalente, que están por arriba de los 637 mg/L, en los efluentes de las industrias de curtido de cuero, los cuales sobrepasan los valores máximos permisibles de 0.10 mg/L según D.S. N° 010-2010-MINAM (García, 1993,).

En metalurgia extractiva se conoce como lixiviación al proceso de extraer desde un mineral una especie de interés por medio de reactivos que la disuelven o transforman en sales solubles. En otras palabras, en la lixiviación se recuperan especies útiles desde una fase líquida, correspondiente a la sustancia o una sal de esta en disolución acuosa. Los minerales que usualmente son lixiviados son aquellas menas oxidadas (óxidos, carbonatos, sulfatos, silicatos, etc.).

4.7. BIORREMEDIACIÓN

La biorremediación es el proceso que utiliza las habilidades catalíticas de los organismos vivos para degradar y transformar contaminantes tanto en ecosistemas terrestres como acuáticos que presenten un enorme potencial en la mitigación de la contaminación. La biorremediación se ha centrado en la explotación de la diversidad genética y versatilidad metabólica que caracteriza a las bacterias para transformar contaminantes en productos inocuos o, en su defecto, menos tóxicos, que pueden entonces integrarse en los ciclos biogeoquímicos naturales. (Ponce, 2007)

Muchos tratamientos biotecnológicos de contaminantes son considerados biorremediación, sin embargo, la biotecnología es tecnología que usa elementos biológicos, sea un organismo o una enzima para mejorar la biodiversidad.

“En estricto rigor un sistema de tratamiento de efluentes o un sistema de compostaje no son biorremediación, son tratamientos biológicos o mixtos para evitar la contaminación, en cambio la biorremediación se utiliza para revertir un daño”.

Tanto el tratamiento de residuos como la biorremediación usan microorganismos, pero lo distintivo de la biorremediación es la aplicación de una tecnología a posteriori,

una vez que se ha producido el daño ecológico. (Pérez, 2010) La biorremediación puede ser empleada para atacar contaminantes específicos del suelo y aguas y aire. (Gutiérrez, 2013)

4.7.1. TIPOS DE BIORREMEDIACIÓN

Degradación enzimática. - El empleo de enzimas en el sitio contaminado con el fin de degradar polímeros y sustancias nocivas. Las enzimas se obtienen en cantidades industriales por bacterias que las producen naturalmente, o por bacterias modificadas genéticamente. (Ponce, 2007)

Remoción microbiana. - Uso de microorganismos directamente en la contaminación que puede dar como resultado compuestos poco solubles en agua o bien compuestos volátiles. (Ponce, 2007)

Bioadsorción. - Retención del contaminante mediante una interacción fisicoquímica con ligando pertenecientes a la superficie celular. Esta interacción se produce con grupos funcionales expuestos hacia el exterior celular pertenecientes a partes de moléculas componentes de las paredes celulares.

Bioacumulación. - Sistema de transporte de membrana que internaliza al contaminante presente en el entorno celular con gasto de energía.

Biom mineralización. - Precipitación de contaminantes a carbonatos e hidroxilos mediante un mecanismo de resistencia codificado en plásmidos.

Biotransformación. - Cambio químico sobre el contaminante puede dar como resultado compuestos poco solubles en agua o bien compuestos volátiles.

Remediación por plantas. - Uso de plantas para limpiar ambientes contaminados, Algunas especies vegetales tienen la capacidad de absorber, acumular y tolerar altas concentraciones de contaminantes como metales pesados, compuestos orgánicos y radioactivos. (Gutiérrez, 2013)

4.8. Biorreducción

Para que los microorganismos puedan crecer y desarrollar sus funciones vitales necesitan un aporte de nutrientes, así como aceptores y donantes de electrones, estos últimos son imprescindibles como fuente de energía. Debido a que algunos metales pesados pueden actuar como aceptores y donantes de electrones, las bacterias pueden biotransformarlos; esto, en el caso del cromo, involucra un cambio químico sobre dicho metal (biorreducción). (Flores, 2012)

Estos tratamientos disminuyen la toxicidad de otros contaminantes inorgánicos como metales tóxicos a través de la actividad biológica natural, mediante reacciones que forman parte de sus procesos metabólicos. Estos tratamientos utilizan bacterias, hongos y plantas para detoxificar las sustancias de riesgo para el hombre y el medio ambiente. Para que los tratamientos sean efectivos no sólo hay que tener en cuenta factores biológicos, como la existencia de poblaciones microbianas susceptibles de transformar los contaminantes, la presencia de nutrientes y oxígeno u otros aceptores de electrones alternativos, sino también factores ambientales como el tipo de suelo, la temperatura y el pH. (Bernad, García, & Valiño, 2007)

4.9. bioadsorción

Las células microbianas pueden ser funcionales en la inmovilización de una o más especies metálicas, actuando como un bioadsorbente. Es un proceso no enzimático y no mediado metabólicamente, se basa en la afinidad por se dé la pared celular hacia iones metálicos en solución, debido a la composición de su estructura. Estos procesos son factibles con biomasa viva o muerta, así como productos derivados. La bioadsorción puede ser considerada el primer paso en la interacción metal-microorganismo, ya que involucran la captura del metal. La adsorción se debe a la unión no específica de la especie iónica a grupos funcionales de los polisacáridos y a las proteínas superficiales asociados a la célula o a metabolitos excretados. (Hernández, 2008)

El uso de biomasa muerta o productos derivados de ella elimina el problema de la toxicidad, no solo de la provocada por metales disueltos, sino también por condiciones adversas de operación, además del componente económico de mantenimiento

incluyendo el suplemento de nutrientes. Sin embargo, las células vivas pueden presentar una variedad más amplia de mecanismos para la acumulación de metales como el transporte, la formación de complejos extracelulares y la precipitación (Villanueva, 2000). La eficiencia de un proceso de bioadsorción depende de las condiciones físico-químicas de la solución en que se encuentre el metal, entre los que se encuentran, el pH, la temperatura, la concentración inicial del metal, la fuerza iónica, entre otros (Naranjol, Ratón, Álvarez, & Silva, 2013)

4.9.1. PARÁMETROS QUE AFECTAN EL PROCESO DE BIOADSORCIÓN

La bioadsorción ya sea de metales como de contaminantes orgánicos es dependiente de varios parámetros. El comportamiento y mecanismos de bioadsorción de diferentes sistemas. La capacidad de bioadsorción de metales iónicos generalmente depende de varios parámetros:

- 1.- Propiedades físico-químicas del metal o compuesto a remover: especie, tamaño, carga iónica. Por lo que antes de iniciar el estudio del sistema de adsorción, es importante conocer la química del compuesto en solución.
- 2.- Propiedades del material bioadsorbente: forma de preparación y características de la superficie celular, área de superficie específica, volumen de porosidad, tamaño de la partícula, fuerza de unión iónica, que dependerá del tipo o tipos de sitios de unión responsables del secuestro del metal. Además, el estado fisiológico de la bacteria puede influir, su estatus nutricional, la edad de las células, disponibilidad de micronutrientes (metálicos) durante el crecimiento, genética, características bioquímicas y celulares
- 3.- Condiciones ambientales: pH de la solución, temperatura, presencia de iones fuertes, competencia de otros iones metálicos suaves e intermedios en solución y sus respectivas concentraciones, el tiempo de contacto y otros compuestos que pueden acomplejar al ión metálico o precipitar (Hernández, 2008)

4.10. REDUCCION DEL CROMO VI A CROMO III

El cromo existe en una amplia gama de estados de oxidación desde -2 a +6, siendo las especies dominantes en la naturaleza el hexavalente (Cr^{6+}) y trivalente (Cr^{3+}). El cromo hexavalente, por lo general presente como cromato (CrO_4^{2-}) y dicromato ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$), posee niveles de toxicidad más elevados comparado con otros estados de valencia. Además de ser altamente perjudicial, es móvil y tiene un elevado período de residencia en las aguas superficiales y subterráneas, lo que supone un riesgo para la salud de los seres humanos y animales, afectando además el desarrollo y crecimiento de las plantas. El Cr (III), en cambio es mucho menos nocivo y se puede separar precipitándolo como hidróxido.

En el caso particular del cromo, la reducción de Cr (VI) a Cr (III) no sólo disminuye la toxicidad del elemento que actúa en los organismos vivos, sino también ayuda a precipitar a un pH cercano a la neutralidad (principalmente como $\text{Cr}(\text{OH})_3$), lo que favorece una mayor eliminación física (Panigatti & Griffa, 2012).

V. MATERIALES Y METODOS

5.1. Aislamiento e identificación de *Pseudomonas sp*

5.1.1 Recolección de muestra:

Se recolectó 20 mL de muestras de diferentes puntos de los cuerpos receptores de Aguas de la curtiembre Chimú del distrito del Porvenir. En la cual se utilizó frascos estériles para su recolección y se trasladó en un coolers a temperatura ambiente.



Figura 5.- Muestra recolectada de los cuerpos receptores de la curtiembre Chimú

5.1.2 Preparación de Medio de Cultivo

Se preparó 82.8 mL de medio de cultivo *Agar Pseudomonas P*, en la cual se pesó 3.7 g de *Agar Pseudomonas P* y luego se agregó 79.1 mL de agua destilada en un matraz de 150 mL. Se colocó en una cocina hasta que hierva la solución y luego se adicionó 0.8 mL de Glicerol y se llevó a la autoclave. Se vació el medio en 4 placas estériles y se espera hasta que se solidifique. Luego se colocó las placas con el medio en la estufa a 32 °C por 24 horas para observar el crecimiento de alguna bacteria como control de calidad de la preparación. Posteriormente se colocó en el refrigerador a una temperatura de 2°C hasta usarlo.

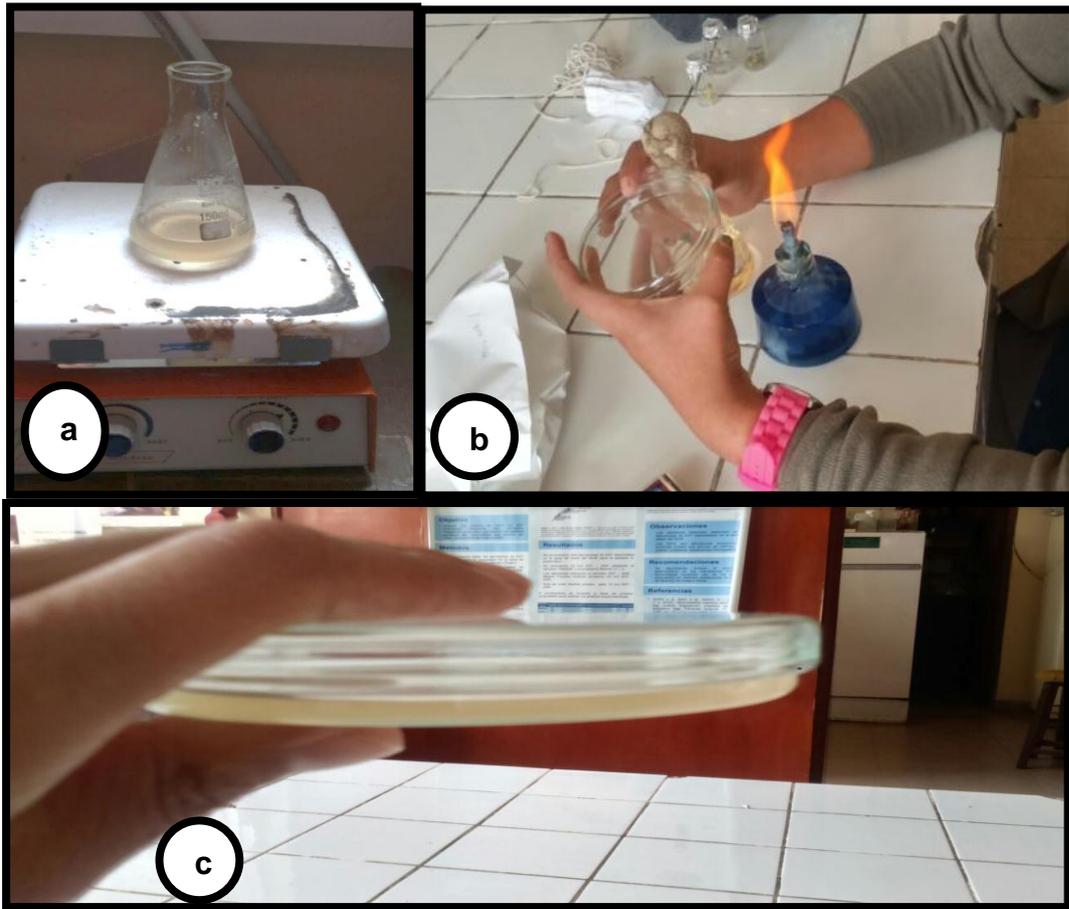


Figura 6. Preparación de medio agar *Pseudomonas*. a) Disolución del medio en calor. b) Vertido en placa del medio preparado. c) Placa preparada con medio para realizar el sembrado.

5.1.3 Siembra y Selección de bacteria

Se dividió en 4 cuadrantes cada placa con el medio de cultivo preparado (*Agar Pseudomonas P*) y se enumeró los cuadrantes de las placas de acuerdo a la cantidad de muestras recolectadas, luego se sembró por estrías con la muestra correspondiente.

Después se llevó a la estufa a 37°C por 24 horas, donde luego se observó el crecimiento de las bacterias y seleccionara la colonia con pigmentación verdosa, características de presencia de bacterias *Pseudomonas*.

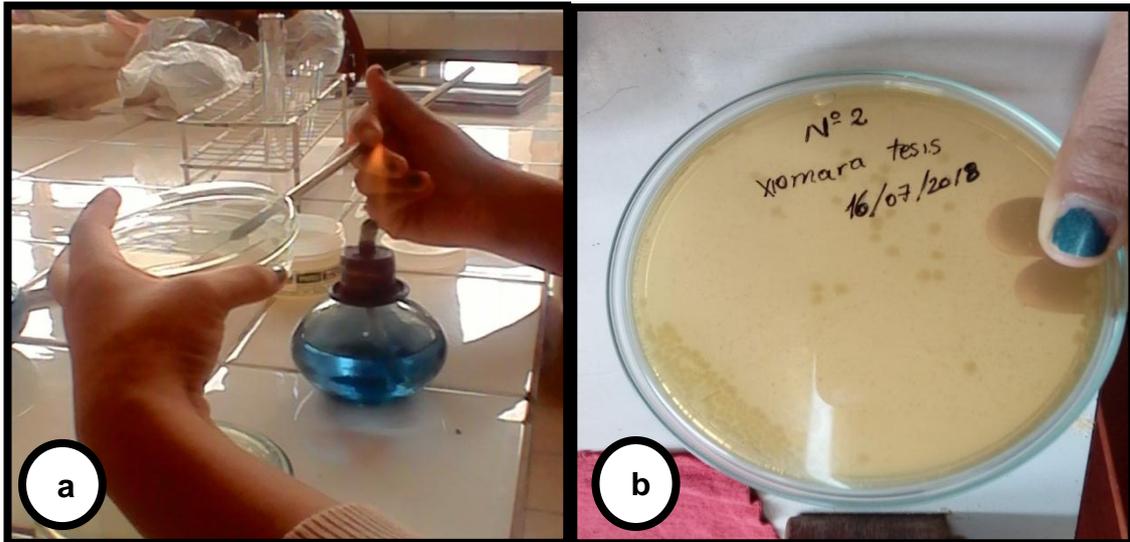


Figura 7. Selección de bacterias. a) Siembra por estrías de muestras recolectadas. b) Placa con bacterias sembradas

5.1.4 Siembra de bacteria seleccionada

Se sembró en un tubo con caldo común una asada de la muestra seleccionada para su aislamiento y aumento de biomasa, luego se colocó en la estufa a 37°C por 24 horas.



Figura 8. Siembra de *Pseudomonas* en tubo con caldo común.

5.1.5 Aislamiento de la bacteria

En un ambiente estéril, se realizó siembra por estrías en una placa con agar Cetrimide luego y se colocó a una estufa a 37 °C por 12 horas, a esperas del crecimiento bacteriano



Figura 9. Aislamiento de *Pseudomonas* en Agar Cetrimide: Se observa la placa con colonias de color verdoso que es característico del medio al resultar positivo la siembra de *Pseudomonas*

5.1.6 Cultivo de *Pseudomonas sp*

Una vez ya aislada la bacteria, se recolectó una azada de las colonias verdosas, característico de *Pseudomonas* (indicador del medio Agar cetrimide), en la cual se realizó la siembra en un medio de cultivo agar común en frasquitos de penicilina, para ser llevado a la estufa a 37° C por 24 horas.



Figura 10. Conservación de *Pseudomonas* en frasquito de penicilina con agar común para su conservación.

5.2 Identificación de *Pseudomonas* sp

5.2.1. Pruebas bioquímicas

5.2.1.1. Medio citrato de Simmons

Se pesó 0.23 g de medio Citrato de Simmons en un matraz de 200 mL y se aforó a 10 mL con agua destilada. Luego se llevó a una coccinilla hasta que hierva, se vertió en un tubo de ensayo para ser llevado a la autoclave.

Cuando el medio ya es retirado de la autoclave se colocó en posición inclinada hasta que se solidificó y se realizó la siembra por estría.

5.2.1.2. Medio SIM (Sulfuro Indol para movilidad)

Se pesó 0.3 g de medio sulfuro Indol para movilidad en un matraz de 200 mL y se aforó a 10 mL con agua destilada. Luego se llevó a una coccinilla hasta que hierva, se vertió en un tubo de ensayo para ser llevado a la autoclave.

Cuando el medio ya es retirado de la autoclave se colocó en posición vertical hasta que se solidificó y se realizó la siembra por punta.

5.2.1.3. Medio LIA (Lisina Hierro)

Se pesó 0.34 g de Agar LIA en un matraz de 200mL y se aforó a 10 mL con agua destilada. Luego se llevó a una coccinilla hasta que hierva, se vertió en un tubo de ensayo para ser llevado a la autoclave.

Cuando el medio ya es retirado de la autoclave se colocó en posición semi inclinada hasta que se solidificó y se realizó la siembra por punta y estría.

5.2.1.4. Medio TSI (Hierro triple azúcar)

Se pesó 0.65 g de Agar TSI en un matraz de 200 mL y se aforó a 10 mL con agua destilada. Luego se llevó a una coccinilla hasta que hierva, se vertió en un tubo de ensayo para ser llevado a la autoclave.

Cuando el medio ya es retirado de la autoclave se colocó en posición semi inclinada hasta que se solidificó y se realizó la siembra por punta y estría.

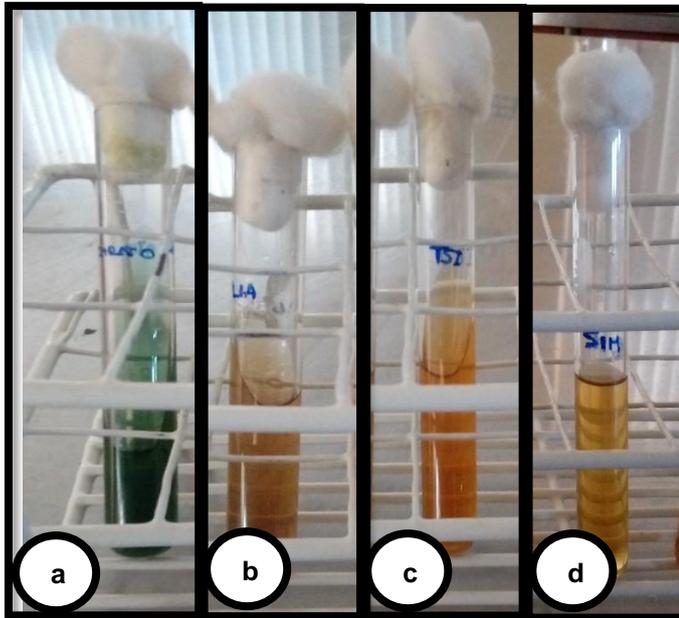


Figura 11. Preparación de medios para identificación. a) Medio citrato, b) medio LIA, c) medio TSI, d) medio SIM, se observan los medios listos en tubos para su posterior siembra.

5.2.2. Tinción Gram

- a) En una lámina portaobjeto, se colocó un asa de solución salina estéril.
- b) Se tomó con el asa una muestra de la bacteria aislada y se colocó a un costado de la solución salina estéril.
- c) Se homogenizó suavemente con movimientos circulares, luego se esperó a que seque la muestra y se flamea unos segundos en el mechero para fijar la muestra.
- d) Luego que la muestra esta seca se cubrió todo el extendido bacteriano con cristal violeta por 1 a 2 min.
- e) Se agregó el lugol por 60 seg.
- f) Se enjuagó con agua corriente
- g) Se agregó dos gotas de alcohol acetona para decolorar e inmediatamente se llevó a enjuagar con agua corriente.
- h) Se agregó safranina por 3 min y se llevó a enjuagar con agua corriente
- i) Luego se dejó secar por unos minutos y se llevó a observar en un microscopio a 100x con aceite de inmersión.

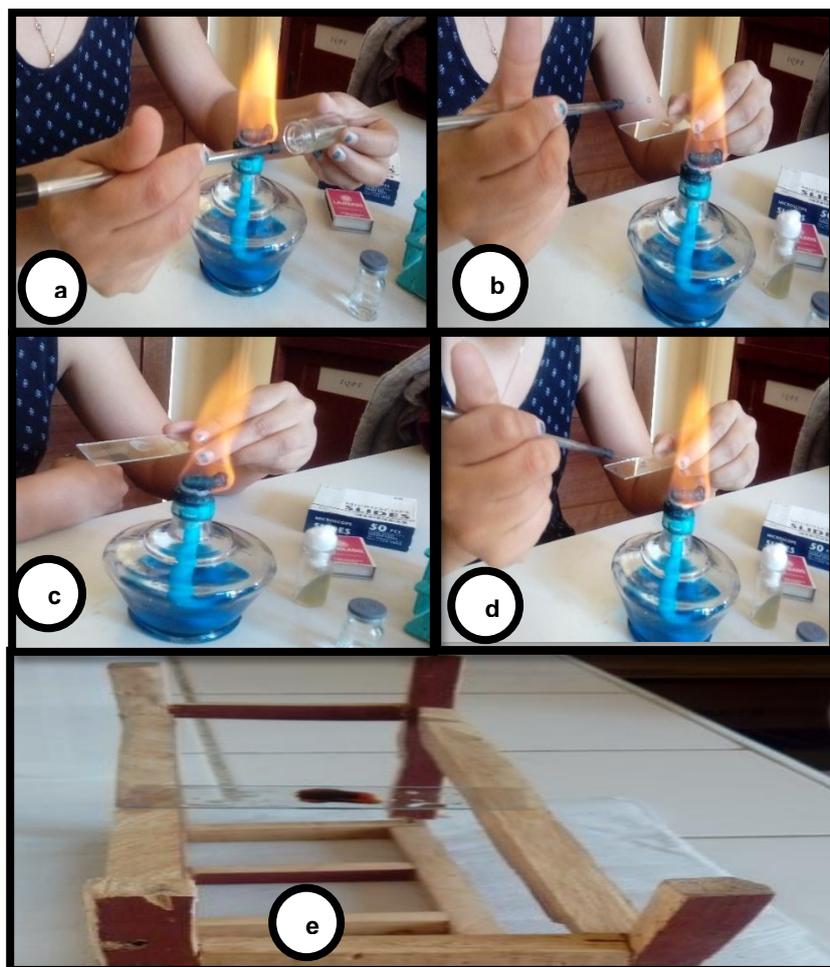


Figura 12. Preparación y observación de la lámina para vista en el microscopio. a) extracción de muestra de *Pseudomonas sp* b) Fijación de la muestra de *Pseudomonas sp* en la lámina portaobjeto. c) Homogenización de la muestra bacteriana con la solución salina. d) Flameado de lámina portaobjeto para su secado. e) Tinción gram.

5.3 Sistema de Tratamiento de biorreducción de cromo VI por *Pseudomonas sp.*

5.3.1 Acondicionamiento del sistema

Se acondicionó un agitador shaker a una temperatura de 37 °C, con 10 matraces de 500 mL de capacidad previamente esterilizados. El agitador shaker estuvo en agitación constante de 120 rpm durante el proceso de biorreducción de cromo con una temperatura de 37°C por un periodo de 40 horas.



Figura 13. Acondicionamiento de Agitador shaker. Se observa el Agitador shaker con matraces y sus parámetros ya establecidos.

5.3.2. Elaboración de los tratamientos: *Pseudomonas sp* a diferentes concentraciones.

5.3.2.1. Siembra del cultivo puro

A partir del cultivo puro obtenido se sembró por estrías en dos placas con agar común, para posteriormente llevarlos a la estufa a 37 °C por 16 horas.

5.3.2.2. Preparación de Solución Madre

A partir del cultivo puro *Pseudomonas sp*, se preparó una suspensión con solución salina fisiológica estéril, similar al tubo N° 4 del Nefelómetro de Mc Farland (12×10^9 bact/mL), de la cual se preparó 20 mL como una solución madre para luego preparar las concentraciones de bacterias *Pseudomonas sp* según la muestra en la siguiente tabla:

Tabla 1. Soluciones Patrón para el sistema de tratamiento

Tratamiento	Especificaciones
A	inóculo de 3×10^8 de <i>Bact</i> /mL
B	inóculo de 3×10^6 de <i>Bact</i> /mL
C	inóculo de 3×10^4 de <i>Bact</i> /mL

Se preparó 20 mL de solución salina estéril, luego se extrajo 9 mL de la solución salina y se agregó 4,5 mL de solución salina a cada placa Petri conteniendo la bacteria de *Pseudomonas* ya crecida se realizó movimientos circulares por un tiempo de 10 min para que se realice el lavado y hasta que haya un desprendimiento de la bacteria.

Luego que la bacteria se desprendiera del medio se procedió a retirar con una pipeta la solución de cada placa y se vertió a un matraz.

Luego en un tubo de ensayo de 15 mL, se colocó 1 mL de la mezcla de la solución de lavado y se le adicionó solución salina estéril hasta obtener una muestra similar al tubo N° 4 de Mc Farland.



Figura 14. Comparación de Concentración madre con Tubo de Mc Farland N° 4.

5.3.2.3. Composición de los Inóculos

En tres matraces previamente desinfectados se colocaron lo siguiente:

Tabla 2. Preparación de tratamientos a utilizar en el proyecto.

Matraz	Especificaciones
Inoculo A (3×10^8 bact/mL)	12.5 mL de la solución madre con 487.5mL de solución salina estéril
Inoculo B (3×10^6 bact/mL)	0.125 mL de la solución madre con 499.87mL de solución salina estéril
Inoculo C (3×10^4 bact/mL)	0.00125 mL de la solución madre con 499.99 mL de solución salina estéril

5.3.3. Preparación del Sistema de tratamiento.

En cada matraz de 500 mL de capacidad, se colocó 169.9 mL de agua de curtiembre, 50 mL de inóculo A, 5 mL de solución de glucosa al 25%, 25 mL de Extracto de carne al 30%, 0.125 mL de solución de CaCl al 32%. Este procedimiento se repitió con el inóculo B y C; (Otiniano Garcia, Collantes, & Lurdes, 2007) luego teniendo todos los matraces listos se colocaron en un agitador shaker durante 40 horas a una velocidad de 120 rpm y a una temperatura de 37°C. Adicionalmente se realizó 3 repeticiones por cada tratamiento establecido.



Figura 15. Agitador Shaker con Matraces. Se observa los matraces de 500 mL con el medio y el agua de curtiembre ya preparados.

5.3.4. Monitoreo y recolección de resultados del sistema.

El monitoreo se realizó cada cuatro horas en donde se tomó una muestra de 18 mL para evaluar la concentración de cromo VI por un periodo de 40 horas. Y en forma paralela se tomó una muestra de 3 ml para realizar la curva de la glucosa y biomasa.



Figura 16. Recolección de resultados. Se observa cada muestra del medio recolectada en frascos estériles con su etiqueta respectiva.

5.4. Evaluación de resultados de bioadsorción de cromo VI.

5.4.1. Análisis por espectrofotómetro de absorción atómica.

Se realizó el análisis de las muestras obtenidas durante el periodo de 40 horas llevado a analizarlos por espectrofotómetro de absorción atómica para determinar la reducción en la concentración de cromo VI en las diferentes concentraciones de *Pseudomonas sp.*

5.4.2. Cinética

Se evaluó y se realizó una curva con los datos obtenidos para poder visualizar la biorreducción de cromo VI de la muestra de agua residual de la curtiembre.

VI. RESULTADOS

6.1. Identificación de *Pseudomonas sp*

6.1.1. Pruebas Bioquímicas

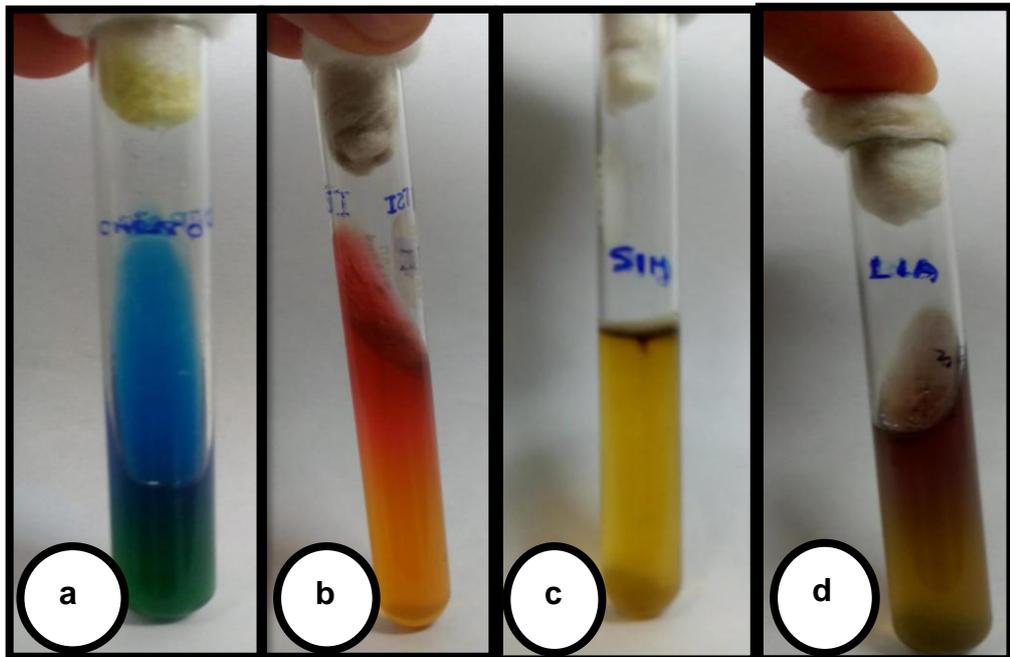


Figura 17. Pruebas Bioquímicas para identificación *Pseudomonas sp* a las 24 horas. a) medio Citrato es positivo se torna el pico de color azul si es positivo a *Pseudomonas sp* b) Medio TSI es negativo se torna de color rojo es alcalino y no fermenta azúcares. c) Medio SIM es negativo no produce indol y no cambia de color y presenta ennegrecimiento. d) Medio LIA se observa un color púrpura y crecimiento de *Pseudomonas sp*

Se observa en la figura 17a, la prueba bioquímica de citrato resulto positivo al desarrollar un color azul en el medio a las 24 horas a partir de la siembra y se observa el crecimiento por donde se realizó la siembra así también como en la figura 18 se muestra el mismo tubo de ensayo a las 48 horas donde se visualiza que todo el medio esta de color azul. Esto indica que la bacteria sembrada es *Pseudomonas sp* porque dicha bacteria usa el citrato como fuente de carbono.

En la figura 17b, se observa que a las 24 horas el medio del tubo de ensayo resulta el pico de flauta de color rojo siendo alcalino y el fondo de color amarillo siendo ácido, pero a las 48 horas se observa el fondo del tubo de ensayo cambio de color a rojo eso indica que hubo una variación y es alcalino como se puede observar en la figura 18 también muestra que no hubo ennegrecimiento en el medio, eso indica que no hay producción de gas.

Se observa en la figura 17c resulta negativo al indol y es positivo a la motilidad al presenciar el crecimiento de la bacteria alrededor de la línea de siembra y por la turbidez que presenta el tubo de ensayo y negativo al H₂S, el cual no refleja el ennegrecimiento en el tubo de ensayo durante las 24 horas. En la figura 18 también se puede mostrar que a las 48 horas transcurridas no hay ningún cambio de resultados.

Se observa en la figura 17d que en el tubo de ensayo el pico de flauta presenta un color violeta y el fondo a un color amarillo por lo tanto el resultado es negativo a la descarboxilación de lisina, ya que las *Pseudomonas* no producen lisina descarboxilasa y no produce sulfuro de hidrogeno como se visualiza que no hay ennegrecimiento en el medio. Al igual en la figura 18 se observa el medio que se torna totalmente en violeta mostrando que ya que no hay producción de lisina al ser una bacteria alcalina y no fermentadora.

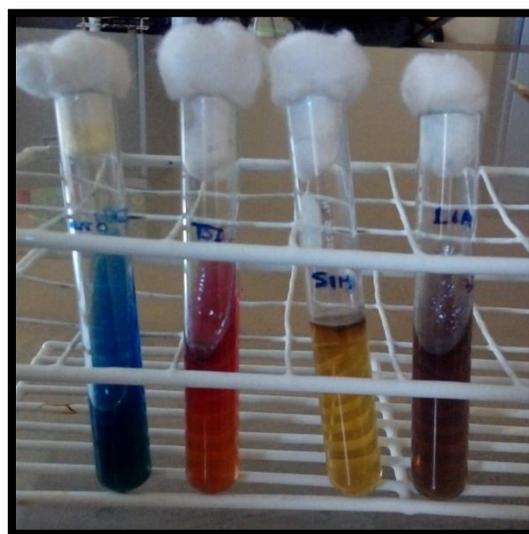


Figura 18. Pruebas Bioquímicas a las 48 horas de reacción.

6.1.2. Tinción Gram

Se observa en la figura 19, la muestra bacteriana se tiñe de color rosado por lo tanto es gram negativa, la cual es característica del género de *Pseudomonas* porque son gramnegativos aerobios y se observa en la figura 20 la forma de la bacteria son bacilos cortos a largos, aislados y en cadena.

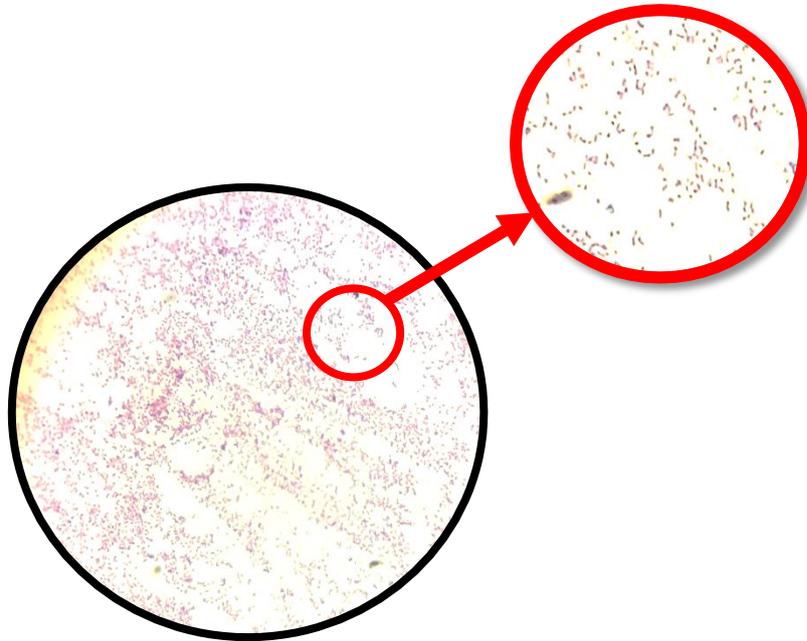


Figura 19. Tinción Gram a 100 x. Se observa que la Tinción Gram es negativa y resulta que es *Pseudomonas* sp en vista microscópica a 100x.

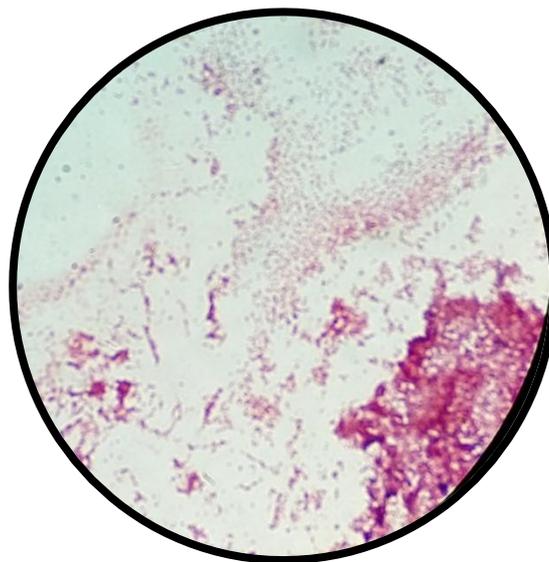


Figura 20. Tinción Gram a 40x. Se observa que la muestra es bacteriana se tiñe de color rosado muestra que es negativo característico de la *Pseudomonas* sp

6.2. BIORREDUCCIÓN DE CROMO

Se realizaron los análisis correspondientes, teniendo como blanco control la muestra de agua residual de curtiembre sin ningún tratamiento donde se determina que la muestra contiene una concentración de 1.6147 mg/L de cromo VI.

Durante la evaluación en la capacidad de reducción de cromo en las aguas residuales de curtiembre por *Pseudomonas sp* se observó que la reducción de cromo VI desde el inicio del tiempo cero, pasado las 21 horas hay una mayor biorreducción de cromo VI durante las 40 horas de tratamiento. En la tabla 3 se presenta la evaluación de bioadsorción de cromo VI utilizando una concentración de *Pseudomonas sp.* al 3×10^8 donde se logró una reducción del 0,2486 mg/L de cromo VI durante el periodo de 40 horas.

Tabla 3. Promedio de biorreducción de cromo VI utilizando *Pseudomonas sp* en concentración de 3×10^8 de *Bact/mL*

Tiempo	Cromo mg/ L
0	1.6033
4	1.5737
8	1.5509
12	1.5349
16	1.5258
20	1.5053
24	1.4870
28	1.4528
32	1.4072
36	1.3935
40	1.3547

Se puede observar que en la tabla 3 los valores de cromo VI son expresados en mg/L y hay una reducción que el microorganismo actúa a partir de las 21 horas aproximadamente como se puede observar en la figura 21.

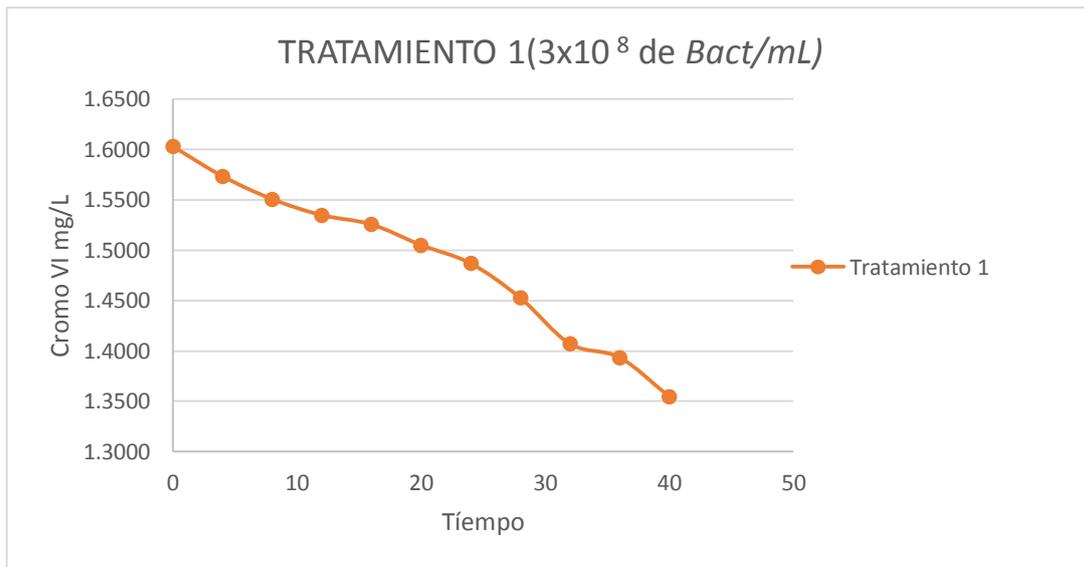


Figura 21: Promedio de biorreducción de cromo VI utilizando una concentración de 3×10^8 bacteria/mL de *Pseudomonas sp*

Se observa en la figura 21 que hay una constante reducción de cromo VI con la concentración del primer tratamiento, así mismo el resultado es el mismo en las repeticiones efectuadas. siendo el tratamiento más efectivo para la reducción de cromo VI en un periodo de 40 horas,

En el segundo tratamiento con el agua residual de curtiembre, pero a una concentración de 3×10^6 bacteria/mL, tal como se observa en la tabla 4 se observa una reducción de cromo VI durante las 40 horas, tratamiento en el cual el análisis reflejo una reducción de 0.2327 mg/L de cromo VI.

Tabla 4. Promedio de biorreducción de cromo VI utilizando *Pseudomonas sp* en concentración de 3×10^6 de *Bact/mL*

Tiempo	Cromo mg/ L
0	1.5988
4	1.5555
8	1.5486
12	1.5281
16	1.5189
20	1.5030
24	1.4711
28	1.4460

32	1.4003
36	1.3844
40	1.3661

Los valores que se muestran en la tabla 4 son de cromo VI expresados en mg/L. Nos muestra que la bacteria ayuda a reducir el cromo al cabo de las 24 horas en un periodo de 40 horas en el segundo tratamiento establecido en las 3 repeticiones, por la cantidad de bacterias que se ha utilizado no evidencio una mayor reducción que el anterior tratamiento.

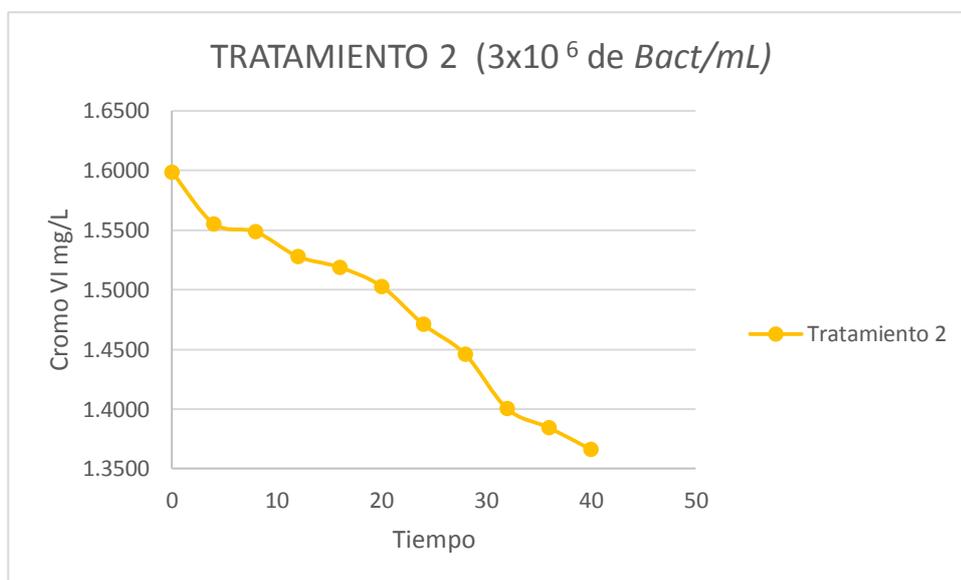


Figura 22: Promedio de biorreducción de cromo VI utilizando una concentración de 3×10^6 bact/mL de *Pseudomonas sp*

En la figura 22 se observa que la reducción de cromo VI con la concentración de 3×10^6 bact/mL es efectiva como se muestra en la gráfica, a partir de las 4 horas comienza la bacteria a actuar en el medio.

En el tercer tratamiento se observa al analizar que los resultados de biorreducción de cromo VI no son tan significantes con el primer tratamiento, pero similar al segundo tratamiento, siendo su valor final de cromo VI algo menor al de los dos primeros tratamientos, en este tratamiento se utilizó una cantidad menor de bacterias por mililitros en donde se observa que la biorreducción de cromo VI es algo baja pero como se puede observar en la tabla 5. Los valores de cromo VI son

relativamente bajos a comparación de los otros primeros tratamientos. El tercer tratamiento tuvo una reducción de 0.2326 mg/L.

Tabla 5. Promedio de biorreducción de cromo VI utilizando *Pseudomonas sp* en concentración de 3×10^4 de *Bact/mL*

Tiempo	Cromo mg/ L
0	1.5896
4	1.5600
8	1.5349
12	1.5372
16	1.5121
20	1.4961
24	1.4642
28	1.4300
32	1.3958
36	1.3889
40	1.3570

La tabla 5 muestra los resultados de cromo VI en mg/L, se puede observar que hay mayor reducción a partir de las 20 horas en el sistema de tratamiento de un periodo de 40 horas.

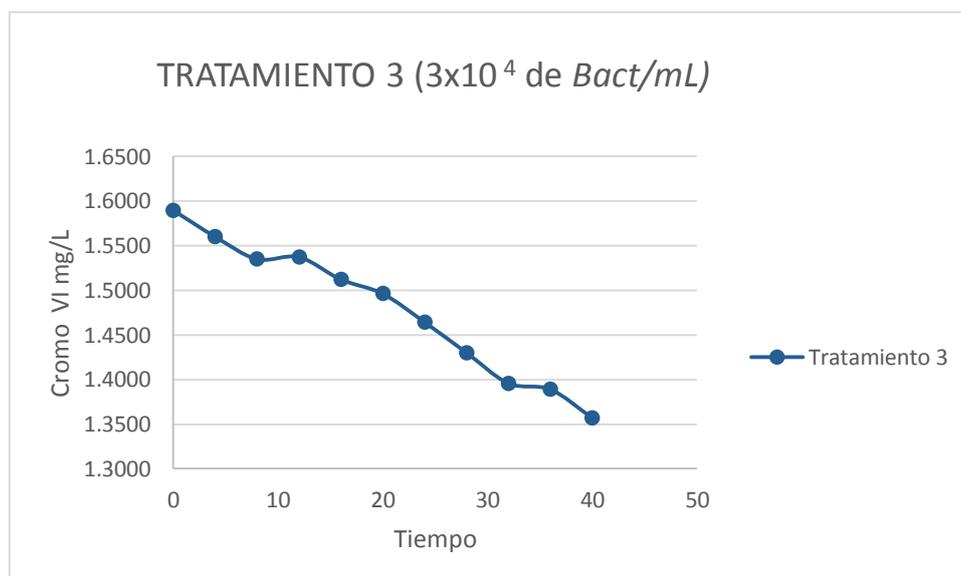


Figura 23: Promedio de biorreducción de cromo VI utilizando una concentración de 3×10^4 *bact/mL* de *Pseudomonas sp*

En la figura 23 se muestra la curva de reducción de cromo VI que resulto tras el tratamiento realizado al agua residual de curtiembre con una concentración de 3×10^4 de *Pseudomonas sp.* no fue el mejor tratamiento, pero sirvió para descartar el que podría desarrollar una mayor reducción de cromo VI

Realizados los 3 tratamientos con sus respectivas repeticiones se puede deducir o inferir que el tratamiento más eficiente es el primer tratamiento en el cual nos muestra una mayor reducción de cromo VI en las aguas residuales de curtiembre. Teniendo en cuenta que el cromo siendo un componente toxico en sus niveles no permisibles el cual afecta en la salud a la población en general y en la provincia de Trujillo ocasionando enfermedades respiratorias, etc. Teniendo en cuenta que los resultados obtenidos mediante un análisis de espectrofotometría de absorción atómica, realizando sus tres repeticiones por cada extracción de muestras en cada uno de los tratamientos para evitar un sesgo o un error en los resultados.

6.3. Prueba Estadística: ANOVA

Antes de realizar la prueba ANOVA es necesario evaluar los supuestos básicos de normalidad y homogeneidad, que a continuación se detalla.

6.3.1. Prueba de NORMALIDAD

Alfa =0,05

Ho: La variable: Biorreducción de cromo VI presenta una distribución normal.

H1: La variable: Biorreducción de cromo VI no presenta una distribución normal.

Tabla 6. Pruebas de Normalidad de los diferentes tratamientos realizados.

Pruebas de normalidad						
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Tratamiento 1	,129	11	,200 [*]	,961	11	,779
Tratamiento 2	,145	11	,200 [*]	,951	11	,650
Tratamiento 3	,135	11	,200 [*]	,951	11	,653

*. Este es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de la significación de Lilliefors

La Tabla muestra la prueba de Kolmogorov-Smirnov y de Shapiro-Wilk, son pruebas para validar la distribución normal de la Biorreducción de cromo VI. En efecto al observar la tabla, todas las significancias (Sig.) a lo largo de los tratamientos son superiores al nivel de significancia 0,05. Esto nos permite aceptar la hipótesis nula. Por lo tanto, se concluye que la Biorreducción de cromo VI tiene aproximadamente distribución normal en cada tratamiento.

6.3.2. Prueba de Homogeneidad de Varianza

Ho: Las varianzas de la Biorreducción de cromo VI por efecto de la concentración de *Pseudomonas sp.* son similares.

H1: Al menos una varianza de la Biorreducción de cromo VI por efecto de la concentración de *Pseudomonas sp.* es diferente.

Tabla 7. Pruebas de Homogeneidad de Varianza

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
0,003	2	30	,997

En la Tabla se presenta la prueba de Levene para comprobar la homogeneidad de varianzas, pues bien, al observar la significancia ($p = 0,997$) se distingue que es superior al nivel de significancia fijado (0,05). Esto nos permite aceptar la hipótesis nula; es decir los datos sobre Biorreducción de cromo VI son evidencias suficientes para concluir que efectivamente existe homogeneidad de varianzas a lo largo de las concentraciones de *Pseudomonas sp.*

Habiéndose cumplido los supuestos, entonces es conveniente aplicar la prueba ANOVA

6.3.3 ANOVA

Ho: Las medias aritméticas de la Biorreducción de cromo VI por efecto de las concentraciones de *Pseudomonas sp.* son similares.

H1: Al menos una de las medias aritméticas de la Biorreducción de cromo VI por efecto de las concentraciones de *Pseudomonas sp.* es diferente.

Tabla 8. Factor ANOVA de los diferentes tratamientos realizados.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Tratamientos	,001	2	,0001	,058	,944
Error Experimental	,181	30	,006		
Total	,181	32			

La Tabla ANOVA muestra que la significancia ($p = 0,944$) es superior al nivel de significancia fijado ($0,05$), esto significa que se acepta la hipótesis nula, es decir que se ha demostrado que las concentraciones de *Pseudomonas sp.* no ha causado efecto significativo sobre la Biorreducción de cromo VI, con lo cual se dice que son estadísticamente similares a lo largo de las concentraciones de *Pseudomonas sp.*

6.4. CINETICA

Se utilizó la ecuación de la recta de la curva de calibración de glucosa y biomasa (ver anexo 4 y 5) para poder obtener resultados en g/L del sustrato y biomasa de los diferentes tratamientos para observar en las gráficas realizadas el comportamiento de la bacteria en el sistema de tratamiento de Biorreducción de cromo VI.

$$\text{Biomasa: } y = 136.65x - 0.0451$$

$$\text{Sustrato : } y = 0.6424x - 0.0583$$

Si la ecuación de la recta es $y = mx + b$, y ya Teniendo estas ecuaciones de la recta de la curva de calibración, se reemplazó la absorbancia en Y, quedando la ecuación de la siguiente manera:

$$x = \frac{y - b}{m}$$

En la tabla 9 se muestra la absorbancia producida en la fermentación con el primer tratamiento en la biorreducción de cromo VI utilizando una concentración de *Pseudomonas sp* de 3×10^8 bact/mL.

Tabla 9. Cinética de Biomasa VS Sustrato utilizando *Pseudomonas sp* en concentración de 3×10^8 de *Bact/mL* con reducción de cromo.

Ti	Absorbancia de DNS	Sustrato (g/L)	Absorbancia de biomasa	Biomasa (g/L)	Cromo (mg/L)
0	4.826	7.603	0.435	0.004	1.6033
4	4.192	6.616	0.812	0.006	1.5737
8	3.770	5.959	1.029	0.008	1.5509
12	3.867	6.110	1.097	0.008	1.5349
16	3.904	6.168	1.206	0.009	1.5258
20	3.200	5.072	1.030	0.008	1.5053
24	3.032	4.811	1.016	0.008	1.4870
28	3.356	5.315	1.200	0.009	1.4528
32	3.028	4.804	1.348	0.010	1.4072
36	2.036	3.260	1.850	0.014	1.3935
40	1.826	2.933	2.595	0.019	1.3547

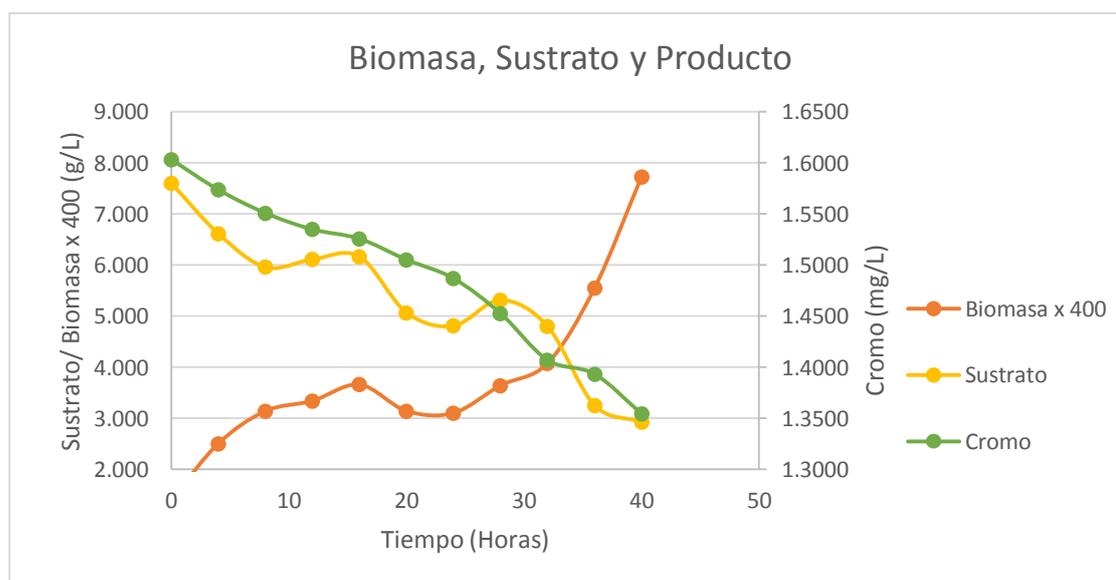


Figura 24: Cinética de biomasa, sustrato y producto utilizando una concentración de 3×10^8 *bact/mL* de *Pseudomonas sp* con agua residual de cromo.

Al analizar el comportamiento de la bacteria con el sustrato en las primeras horas se observa que hay un mayor consumo de sustrato que influye bastante en el crecimiento de *Pseudomonas sp*, el sustrato consumido fue de 4.67 g/L. se evidencia

que a partir de las 16 horas la biomasa comienza a disminuir y se mantiene el crecimiento esto se debe a que encuentran poco sustrato en el medio y hay un agotamiento de nutrientes, pero a las 28 horas se recupera el crecimiento teniendo un mayor consumo de sustrato. Esto posiblemente se debe a factores que pueden influir en la cinética de crecimiento donde la bacteria comienza a desarrollar una fase de maduración hasta que obtenga luego una estabilización con el tiempo transcurrido en el sistema de tratamiento adicionando que el cromo puede afectar su metabolismo de su crecimiento al realizar la degradación del cromo VI. Asimismo, se observa en la gráfica que el producto, en este caso el cromo, se observa como hay una reducción mediante la biomasa aumenta.

En la tabla 10 se muestra la absorbancia producida en la fermentación con el primer tratamiento en la bioadsorción de cromo VI utilizando una concentración de *Pseudomonas sp* de 3×10^6 bact/mL. Con la misma concentración de sustrato en el anterior tratamiento.

Tabla 10. Cinética de Biomasa VS Sustrato utilizando *Pseudomonas sp* en concentración de 3×10^6 de *Bact/mL* con reducción de cromo.

T2	Absorbancia de DNS	Sustrato (g/L)	Absorbancia de biomasa	Biomasa (g/L)	Cromo (mg/L)
0	3.821	6.039	0.955	0.007	1.5988
4	4.696	7.401	0.446	0.004	1.5555
8	3.404	5.390	1.472	0.011	1.5486
12	3.338	5.287	1.008	0.008	1.5281
16	3.760	5.944	1.222	0.009	1.5189
20	3.502	5.542	0.934	0.007	1.5030
24	3.240	5.134	1.380	0.010	1.4711
28	3.990	6.302	1.532	0.012	1.4460
32	3.642	5.760	1.798	0.013	1.4003
36	3.540	5.601	2.011	0.015	1.3844
40	3.052	4.842	2.205	0.016	1.3661

Se observa en la tabla 10 que el sustrato consumido es de 1.2 g/L en el sistema de tratamiento de 40 horas, eso quiere decir que la bacteria no consumió, aunque se observa que se desarrolló mayor biomasa que el tratamiento anterior. En la Figura 25 se observa como la se disminuye la concentración inicial del sustrato en la

bioadsorción de cromo VI y la biomasa aumenta indicando que hubo un mayor crecimiento bacteriano, aunque a partir de las 24 horas de incubación hay un crecimiento más significativo hasta las 40 horas que el crecimiento empieza a recuperar el crecimiento bacteriano.

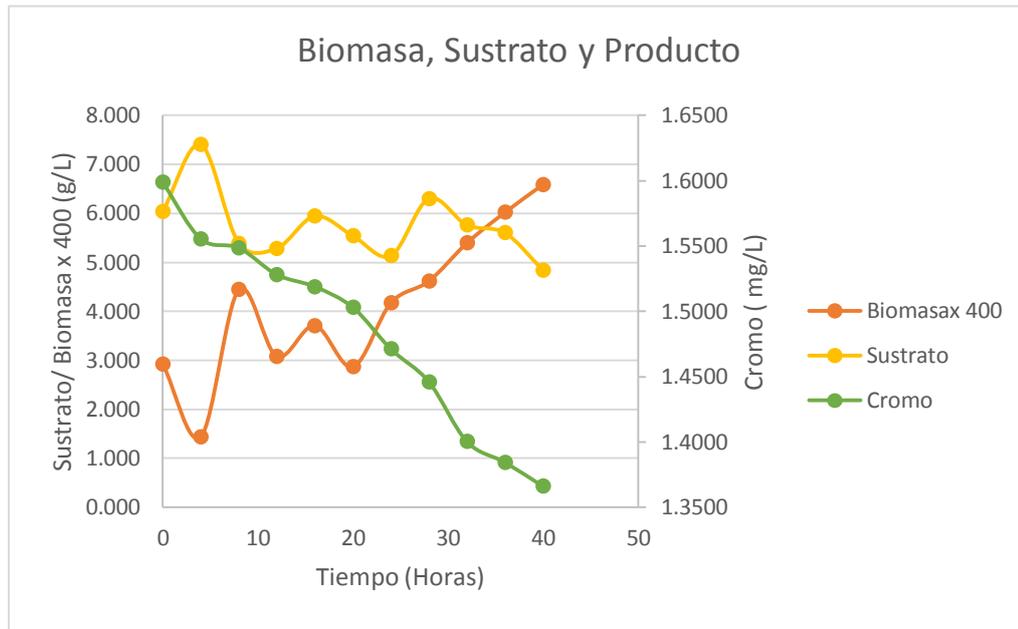


Figura 25: Cinética de biomasa, sustrato y producto utilizando una concentración de 3×10^6 bact/mL de *Pseudomonas sp* con agua residual de cromo.

En la figura 25 se observa como el sustrato que no hay un mayor consumo de sustrato y que se mantiene. Teniendo en cuenta que se utilizó una menor concentración de biomasa se obtuvo un menor consumo de sustrato donde se puede establecer la diferencia con el tratamiento anterior donde se evidencia un mayor consumo de sustrato en el periodo de fermentación de 40 horas. También se observa en la gráfica que el producto, en este caso el cromo, se observa como hay una reducción mediante la biomasa aumenta.

En la tabla 11 se muestra la absorbancia producida en la fermentación con el primer tratamiento en la biorreducción de cromo VI utilizando una concentración de *Pseudomonas sp* de 3×10^4 bact/mL. Con la misma concentración de sustrato en el anterior tratamiento.

Tabla 11. Cinética de Biomasa VS Sustrato utilizando *Pseudomonas sp* en concentración de 3×10^4 de *Bact/mL* con reducción de cromo.

T3	Absorbancia de DNS	Sustrato (g/L)	Absorbancia de biomasa	Biomasa (g/L)	Cromo (mg/L)
0	4.426	6.981	0.309	0.003	1.5896
4	5.192	8.173	0.352	0.003	1.5600
8	4.417	6.967	0.567	0.004	1.5349
12	4.889	7.701	0.441	0.004	1.5372
16	3.693	5.840	0.810	0.006	1.5121
20	3.758	5.941	1.362	0.010	1.4961
24	3.622	5.729	1.334	0.010	1.4642
28	3.620	5.726	1.162	0.009	1.4300
32	2.530	4.029	1.765	0.013	1.3958
36	2.014	3.226	1.878	0.014	1.3889
40	1.723	2.773	2.203	0.016	1.3570

Por otro lado, en la tabla 11 se muestran los resultados obtenidos mediante del análisis de espectrofometria y al reemplazar en las ecuaciones de la recta se obtiene que se consumió 4.2 g/L de sustrato, pero en los resultados de biomasa no fue mayor a los resultados anteriores, esto se debe a que se utilizó una concentración menor que los tratamientos anteriores.

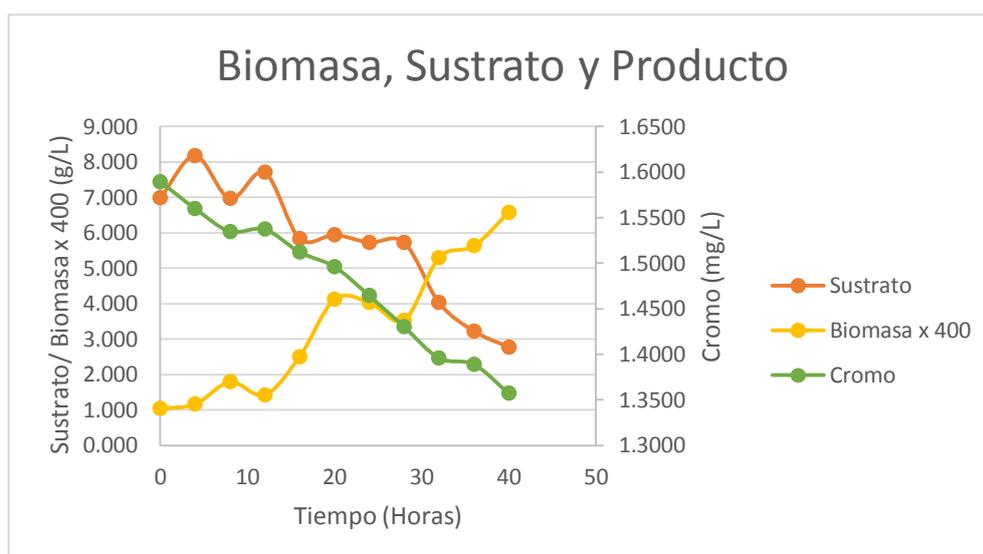


Figura 26: Cinética de biomasa, sustrato y producto utilizando una concentración de 3×10^6 *bact/mL* de *Pseudomonas sp* con agua residual de cromo.

En el último tratamiento se observa que tuvo un mejor crecimiento exponencial como se observa en la figura 26, a partir de las 12 horas inicia un mayor crecimiento y un mayor consumo de sustrato hasta las 20 horas donde el crecimiento se mantiene y, lo cual comienza a incrementar la biomasa a partir de las 28 horas y hay un consumo de sustrato constante. Se observa que el género *Pseudomonas* logra un crecimiento con los nutrientes del sistema de tratamiento con las condiciones dadas. También se observa en la gráfica que el producto, en este caso el cromo, se observa como hay una reducción mediante la biomasa aumenta.

Se evaluó el comportamiento las diferentes concentraciones de *Pseudomonas* con la misma concentración de sustrato y se observa que el comportamiento de consumo de sustrato es diferente en los tres tratamientos. Así mismo hay un mejor crecimiento microbiano en el primer tratamiento y el segundo y tercer tratamiento tuvieron un crecimiento semejante donde se puede saber que las concentraciones utilizadas en dichos tratamientos se obtendrán resultados semejantes, aunque el consumo de sustrato en el tercer tratamiento fue mayor ya que se necesitó una mayor cantidad de sustrato para la producción de biomasa

Así mismo se desarrolló una cinética de la bacteria para poder observar su velocidad específica de cada tratamiento para determinar el crecimiento bacteriano de *Pseudomonas sp* donde se muestra las diferentes constantes específica de velocidad de crecimiento para observar su comportamiento al interactuar con la muestra de agua residual de cromo.

Tabla 12. Valores de biomasa para hallar la constante específica de velocidad de crecimiento del tratamiento N° 1 con agua residual de cromo.

Tratamiento 1	
Tiempo (hr)	Biomasa (g/L)
28	0.009
32	0.010
36	0.014
40	0.019

Se realizó la gráfica de con los valores obtenidos de la fase de latencia para determinar la constante de crecimiento de *Pseudomonas sp.* con la muestra de agua residual de cromo

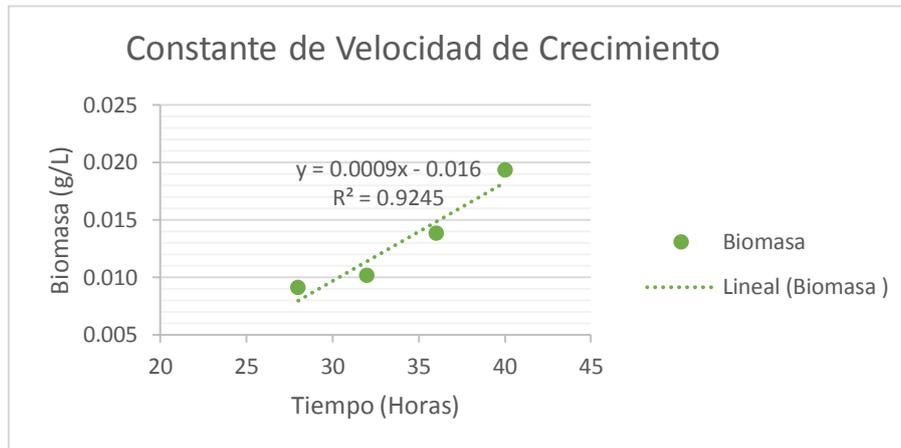


Figura 27: Constante de velocidad de crecimiento del tratamiento N° 1 con muestra de agua residual de cromo.

Se observa en la figura 27. Que la constante de velocidad de crecimiento es de 0.0009 hr^{-1} , la cinética empleadas describen el crecimiento de la especie *Pseudomonas sp.* que se ajustan a un valor experimental con un $R^2 = 0.92$

Tabla 13. Valores de biomasa para hallar la constante especifica de velocidad de crecimiento del tratamiento N° 2 con agua residual de cromo.

Tratamiento 2	
Tiempo (hr)	Biomasa (g/L)
24	0.010
28	0.012
32	0.013
36	0.015
40	0.016

Se realizó la gráfica de con los valores obtenidos de la fase de latencia del tratamiento N° 2 para determinar la constante de crecimiento de *Pseudomonas sp.* con la muestra de agua residual de cromo

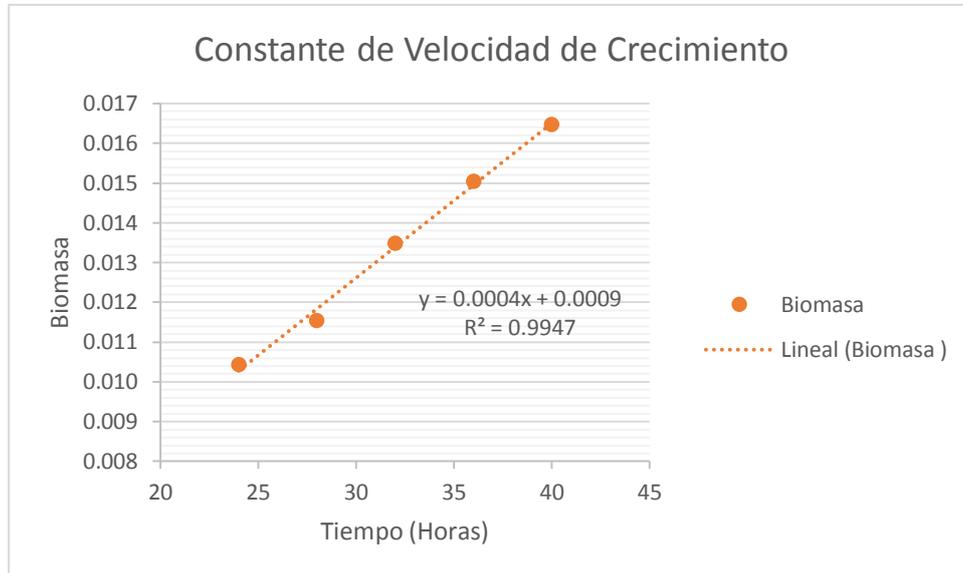


Figura 28: Constante de velocidad de crecimiento del tratamiento N° 2 con muestra de agua residual de cromo.

Se observa en la figura 28. Que la constante de velocidad de crecimiento es de 0.0004hr^{-1} , la cinética empleadas describen el crecimiento de la especie *Pseudomonas sp.* que se ajustan a un valor experimental con un $R^2 = 0.99$

Tabla 14. Valores de biomasa para hallar la constante especifica de velocidad de crecimiento del tratamiento N° 3 con agua residual de cromo.

Tratamiento 3	
Tiempo (hr)	Biomasa (g/L)
28	0.009
32	0.013
36	0.014
40	0.016

Se realizó la gráfica de con los valores obtenidos de la fase de latencia del tratamiento N° 3 para determinar la constante de crecimiento de *Pseudomonas sp.* con la muestra de agua residual de cromo

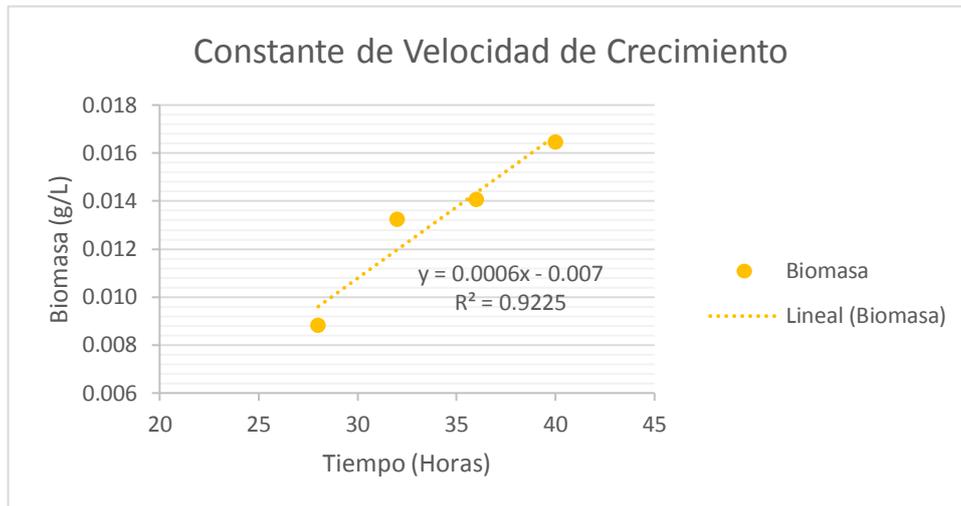


Figura 29: Constante de velocidad de crecimiento del tratamiento N° 2 con muestra de agua residual de cromo.

Se observa en la figura 29. Que la constante de velocidad de crecimiento es de 0.0006 hr^{-1} , la cinética empleadas describen el crecimiento de la especie *Pseudomonas sp.* que se ajustan a un valor experimental con un $R^2 = 0.92$

Las cinéticas empleadas describen el crecimiento de la especie *Pseudomonas* que se ajustan a un valor experimental para hallar la constante de velocidad de crecimiento como se observa en las figuras anteriores, donde hay una correlación de crecimiento utilizando las diferentes concentraciones de bacterias utilizados con una temperatura de 37°C y las condiciones diferentes al sistema de tratamiento empleado y una concentración de sustrato que ayude al crecimiento bacteriano.

7. DISCUSION:

Pseudomonas sp es un bacilo Gram negativo aerobio, no formador de esporas. Las especies de genero son móviles, debido a la presencia de uno o más flagelos polares la mayoría de células de *P. aeruginosa* presentan un único flagelo polar. La movilidad les permite responder a estímulos químico, así como localizar substratos en bajas concentraciones (Martinez, 2007). Los miembros del género *Pseudomonas* son un amplio grupo de cepas bacterianas Gram-negativas no entéricas, en general no fermentativas y móviles (Scaperllini, Franzetti, & Galli, 2004)). Los miembros del género *Pseudomonas* son las cepas de *Pseudomonas* de interés para el hombre se encuentran en alguna de las siguientes categorías: patógenos, biodegradadores o controladores biológicos. (Floriano, 2009)

Las bacterias Gram negativas hace que su frecuencia sea alta y sean más utilizadas en procesos de biorremediación ya que algunas tienen la capacidad de producir exopolímeros o capsulas, sin embargo las bacterias que demostraron mejor tolerancia y crecimiento en concentraciones más altas poseen otro tipo de mecanismo que les permiten la capacidad de resistir concentraciones de cromo VI altas, esto puede suceder con bacterias como *Pseudomonas sp*, *Acinetobacter sp* y *Stenotrophomonas sp* las cuales poseen características de reducción de Cr (VI) a Cr (III) por enzimas solubles en el citoplasma conocidas como cromo reductasas. (Perea, Poveda, Leal, & Diaz, 2014) Como se puede observar en los resultados la bacteria *Pseudomonas sp* tiene una acción reductora al cromo, demostrando así que esta bacteria puede actuar de manera de beneficiosa en los procesos de Biorremediación, llevando a cabo tratamiento de efluentes en las empresas de curtiembres.

En el medio Citrato de Simmons la prueba positiva está representada por la producción de un color azul oscuro que indica que el microorganismo capaz de utilizar el citrato contenido en el medio, con formación de productos alcalinos, también puede leerse la prueba como positiva sin que haya color azul si hay desarrollo visible en la estría de inoculación. Esto es válido para que el desarrollo sea visible el microorganismo debió haber ingresado en la fase logarítmica de crecimiento, lo que solo es posible si ha asimilado carbono y nitrógeno. La lectura del trazo es incubando el tubo durante 24 horas a más, momento en que se desarrolla el color azul. Algunas Bacterias pueden obtener energía de fuentes distintas de fermentación de carbohidratos, con el citrato como única fuente de carbono como muchos miembros

de la familia enterobacteriaceae. (Larios, 2009) y esto se puede afirmar con los resultados obtenidos donde se evidencia que el resultado obtenido en la elaboración y siembra de *Pseudomonas sp* su coloración del medio final es azul después de las 24 horas de incubación.

En el medio TSI se observa que no hay fermentación de la lactosa ni de glucosa (alcalino /alcalino), Hay microorganismos incapaces de fermentar los hidratos de carbono y utilizan las peptonas en forma aeróbica en el pico, quedando el fondo sin cambio de color (alcalino/sin cambio) (Pucci, 2017). La degradación del azúcar y la producción de ácido que la acompaña son detectado por el indicador de pH rojo fenol, que cambia el color del rojo anaranjado al amarillo, en la alcalinización se vuelve rojo profundo. El tiosulfato se reduce a sulfuro de hidrógeno por varias especies de bacterias, el sulfuro de hidrógeno reacciona con una sal de hierro para dar sulfuro de hierro negro. (Merck, 2005).

El medio SIM también sirve para determinar movilidad y producción de sulfhídrico, antes de adicionar el reactivo. Movilidad: se observa por un crecimiento fuera de la zona de punción. H₂S: algunas bacterias pueden liberar SH₂ de aminoácidos por acción enzimática (Pucci, 2017) La motilidad está indicada por una turbidez difusa del medio de cultivo rodeando la línea de punción. En caso de inmotilidad, crecimiento se lleva a cabo únicamente a lo largo de la línea de punción. La formación sulfuro se muestra por un ennegrecimiento en aquellas áreas del medio en el que crecimiento microbiano. (Merck, SIM Medium, 2005).

El medio LIA tiene por objetivo demostrar simultáneamente la presencia de la enzima lisina descarboxilasa (LDC) o lisina desaminasa (LDes.) y la producción de ácido sulfhídrico. (Pucci, 2017). El purpura de bromocresol, es el indicador de pH, el cual es de color amarillo a pH igual o menor a 5.2, y de color violeta a pH igual o mayor a 6.8. Los microorganismos que no producen lisina descarboxilasa, pero que son fermentadores de la glucosa, producen un viraje de la totalidad del medio de cultivo al amarillo (Britania, 2015). La formación de sulfuro de hidrogeno (H₂S) produce una coloración negra debido al sulfuro de hierro producido. (Caffer, 2008)

En la tabla 3, la que fue el primer tratamiento se utiliza un inculo de bacterias de 3×10^8 bact/mL en la cual resulto con el 0,2486 ml/L de reducción de cromo VI en una corrida de 40 horas la cual este tratamiento fue efectivo el número de bacterias dado

en el tratamiento ocasiono un mejor rendimiento, por lo cual resulta que las bacterias terminen en una fase en una fase exponencial, provocando que haya una mayor reducción de cromo VI al ejecutar la prueba. En una investigación de Rigoberto Martínez (2010) nos dice que observando que a tiempos iniciales el metal se absorbe mejor a mayor concentración de la biomasa (76% y 91% a los 90 minutos de incubación a 28°C y 100 rpm, para 5 y 10 g de biomasa, respectivamente), pero a los 5 días de incubación la remoción es muy parecida y muy eficiente para ambas biomasa. Es por ello que al utilizar la concentración de 3×10^8 muestra una mayor reducción que al utilizar las otras concentraciones. (Cossich, Tavares, & Ravagnani, 2001)

En la tabla N° 4 que fue el segundo tratamiento se utilizó un inóculo de 3×10^6 bacterias/mL y la reducción es de solo 0,2327 mg/L de cromo VI en la muestras de agua de curtiembre en un periodo de 40 horas y según los autores (Satarupa Dey and Amal Kanti Paul) nos indica que el efecto de la densidad de inóculo del aislado bacteriano seleccionado fue probado en el crecimiento y la reducción de cromato en condiciones de agitación, la densidad celular que va desde 10^5 - 10^{10} células/mL y el estudio de reducción de Cr (VI) se llevó a cabo bajo cultivo discontinuo. (Dey & Paul, 2015) El tratamiento dado esta dentro del margen propuesto de los autores y por lo tanto si se muestra un resultado de reducción por la bacteria *Pseudomonas sp.* Ya que es efecto es notorio al cumplir las 40 horas, aunque en la reducción también un factor importante sería el pH que se da a las muestras y la bacteria pueda actuar con los factores adecuados para su efectividad. Otiniano García, en comparación con su investigación encuentra una reducción progresiva, los niveles de reducción no son muy significativos (0,37 a 0,35 ppm durante las primeras 48 horas biomasa ocurre durante las primeras 24 horas de tratamiento utilizando aproximadamente una cantidad de 3×10^6 bacterias /mL, (Otiniano Garcia, Collantes, & Lurdes, 2007)

En la Tabla N° 5 que fue el tercer tratamiento se utilizó un inóculo de 3×10^4 bacterias/mL y nos resultó solo la reducción de 0,2326mg/L de cromo VI en la muestra de agua de curtiembre lo que dicha concentración de bacterias no resulto adecuada en la cual los autores (Satarupa Dey and Amal Kanti Paul) nos dicen que en la concentración de células inferior (10^5 células) ml/g sólo el 56% de Cr (VI) se redujo con fuente de carbón de glucosa donde se redujo 73% de inicial Cr (VI).

Además, el aislado fue capaz de utilizar una amplia variedad de donadores de electrones incluyendo azúcar, alcoholes de azúcar, aminoácidos y ácidos orgánicos con una variación considerable de la eficiencia de la reducción. Extracto de levadura y propionato eran menos eficientes como donadores de electrones para SUK 1205 mostrando sólo el 21,2 y el 17,4% de reducción de cromato, respectivamente (Dey & Paul, 2015). De acuerdo a Susan Mayta Mendoza y Susan Vela Espinoza (2015) se puede comprobar que las concentraciones bajas de bacterias no habrá una mayor reducción. Utilizaron una concentración inicial de 10^4 UFC/mL de *Pseudomonas putida* a una temperatura constante de 30 °C y se observa que el proceso de degradación es lento hasta las 192 horas, donde no se logra obtener concentraciones de Cr VI inferiores al límite máximo permisible para efluentes. (Mendoza & Espinoza, 2015)

Sala y Granhen (2001) al estudiar la aplicación de la biorreducción en la remoción de cromo de efluentes de curtiembres, determinaron que el pH de la solución tiene una influencia muy grande, logrando las mayores remociones a pH 2, mientras que la temperatura al aumentar de 25 a 45 °C provoca una reducción en la capacidad de retención de los adsorbentes. La concentración de cromo hexavalente en el agua residual también pudo haber influido en la disminución de la población bacteriana pues ciertas concentraciones resultan inhibitorias para las bacterias, como lo demostraron al estudiar la diversidad de bacterias resistentes al cromo aisladas de suelos contaminados con dicromato, determinando que la concentración mínima inhibitoria de cromo VI que afectaba el crecimiento de las bacterias aisladas fue de 7,5 uM.

En la cinética microbiana se observa un crecimiento de bacterias a una temperatura ambiente como se observan en las figuras 24, 25 y 26; por lo tanto, se puede decir que *Pseudomonas sp* con las concentraciones empleadas logra a multiplicarse y así incrementar su biomasa. Las curvas de crecimiento de biomasa muestran diferencias en cuanto a la fase exponencial, la concentración máxima de biomasa y la duración de la fase exponencial, cuando se modifica la temperatura de trabajo. Temperaturas superiores a 30°C generan un drástico cambio en la fase estacionaria que se debe a la desnaturalización de proteínas y muerte celular (Price & Sowers, 2004). entre 26°C y 28°C; ya que los ensayos presentaron una máxima velocidad de crecimiento celular de $0,546 \text{ (h}^{-1}\text{)}$ a 28 °C y a 26°C se alcanzó una máxima concentración de Biomasa de

0,4647 g/L. (Vanegas & Ramirez, 2016) de *Pseudomonas* aunque otros estudios muestran que la mayoría de especies del genero *Pseudomonas sp* tienen una temperatura optima de crecimiento entre 30 y 37 °C, pero pueden sobrevivir y multiplicarse en casi cualquier ambiente, incluyendo aquellos con elevado contenido de sales, y en un rango de temperaturas comprendido entre 20-42°C (Martinez L. R., 2007).

En la cinética se observa que el sustrato es consumido por la bacteria cuando hay mayor concentración de bacterias, así mismo se observa en la metodología, el sistema de tratamiento utiliza pocos nutrientes para su crecimiento como se puede evidenciar en otras investigaciones nos dice que el género de esta bacteria son capaces de desarrollarse en sustratos conteniendo el mínimo de nutrientes, la bacteria se desarrolla más en el sustrato peptona + azúcar, debido a que el azúcar representa más nutrientes para las bacterias, al utilizarse como fuente de carbono en la obtención de energía para su activación de su metabolismo. (García, 2002)

8. CONCLUSIONES

- Se determinó los niveles de cromo VI en la muestra de agua residual fueron de 1.6147 mg/L de cromo VI, mediante el análisis de espectrofotometría de absorción atómica.
- Se identificó que la bacteria *Pseudomonas sp* fue aislada del agua residual de curtiembre con medio selectivo Agar Cetrimide.
- Se realizaron los tres tratamientos de los cuales, el primer tratamiento fue el que sostuvo una reducción, la cual fue de 0.2486 mg/L de cromo VI en un periodo de 40 horas, la cantidad de cromo que resultó en los demás tratamientos fue: en el segundo tratamiento hubo una reducción de 0.2327 mg/L de cromo VI en cambio en el tercer tratamiento hubo una reducción de 0.2326 mg/L de cromo VI, esta investigación sirve para ver cuál es la concentración de biomasa óptima para la biorreducción de cromo en un cierto periodo.
- El primer tratamiento demostró una mayor absorción de cromo VI en las aguas residuales de las curtiembres, la cual el pH que se utilizó fue de 7,7 donde el microorganismo *Pseudomonas sp*. Puede soportar ese pH y con sus propiedades ayudó a disminuir el cromo el sistema de tratamiento por un periodo de 40 horas.
- La cinética de biomasa y sustrato de los diferentes tratamientos, se obtiene una mayor biomasa en el primer tratamiento, mayor consumo de sustrato y reducción del producto es en el primer tratamiento que fue de 4.67 g/L

9. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar la extracción de la muestra cada hora para el análisis de cinética de Biomasa vs sustrato en un tiempo de 24 horas, para el comportamiento de la bacteria en el sistema de tratamiento junto con el sustrato.
- Se recomienda realizar el proyecto de investigación a escala industrial por medio de un biorreactor para observar cual es más eficaz en los resultados.
- Se recomienda utilizar el biorreactor con Agitación constante y aireación para ver si la muestra es igual o diferente a una escala de laboratorio.
- Se recomienda realizar un análisis con variación de sustrato y temperatura para observar si hay una mejor reducción
- Se recomienda realizar la biorreducción por un periodo de 72 horas para seguir observando si hay una reducción final.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alexander, M. (1999). *Biodegradation and Biorremediation*. EE.UU: Academic Press.
- Argentina, A. M. (2015). *Efecto de Factores Físicos y Químicos sobre la Remediación de Residuos Sólidos Contaminados con Cr(VI) por Aspergillus niger*. Tucuman, Argentina: Universidad Nacional de Tucuman.
- Arronte, C. (2009). *Pruebas Bioquímicas para la identificación de enterobacterias*. Xalapampa, Mexico.
- Bastidas, C. A. (2016). *Guía para practicas de Laboratorio Microbiología*. Quito, Ecuador: Universidad Las Américas.
- Bernad, I. O., García, J. S., & Valiño, M. D. (2007). *Técnicas de recuperación de suelos contaminados*. Madrid, España: Universidad de Alcalá.
- Bioquímica. (s.f.). Recuperado el 31 de setiembre de 2014, de http://www2.uah.es/tejedor_bio/bioquimica_ambiental/biorremediacion.pdf
- Britania. (2015). *Lisina Hierro Agar*. Buenos aires, Argentina: Laboratorio Britania.
- Britania, L. (19 de 10 de 2018). www.britanialab.com. Obtenido de www.britanialab.com:
https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_5a281f12bf5be.pdf
- Brossa, S. Q. (1983). *Toxicología Industrial*. Barcelona, España: Salvat S.A.
- Caffer, M. I. (2008). *Manual de Procedimientos*. Buenos Aires, Argentina: Centro Regional de Referencia del WHO Global Salm Surv.
- Chávez, G. S. (2010). Pseudomonas aeruginosa: una bacteria fascinante y temible. *III Encuentro - Participación de la Mujer en la ciencia*. Mexico: Instituto de Investigaciones Biomedicas.
- Cossich, E. S., Tavares, C. R., & Ravagnani, T. M. (2001). *Uso da Biossorçãona Remoção de Cromo de Efluente de Curtumes*. Maringá-Brasil: Universidade Estadual de Maringá.
- Dey, S., & Paul, A. K. (2015). Hexavalent Chromate Reduction During Growth and by Immobilized Cells of Arthrobacter sp. SUK 1205. *Science, Technology and Development*, 158-168.
- Diaz, C. (2011). *Adherencia y colonización de Pseudomonas fluorescens sobre sustratos sólidos: influencia de la topografía y composición química de la superficie*. Buenos Aires, Argentina : SIDECI Repositorio Institucional de la UNLP.

- Díaz, C., Jacinto, C., Medina, R., Navarro, A., & Llanos, N. C. (2013). Estudio de la biosorción de cromo (VI) con quitosano cuaternario reticulado para su aplicación en biorremediación de aguas contaminadas. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 304-318.
- Duca, G., Nuñez, C., Navarro, A., & Rubio, C. (2003). *Remediación de Iones Cr(VI) en Soluciones Acuáticas por Aspergillus niger BM-56*. Tucumán, Argentina: Universidad Nacional de Tucumán.
- Flores, Y. S. (2012). *Biorreducción de Cr(VI) a Cr(III) por Bacterias resistentes a cromo aisladas del río Lerma*. Toluca, México: Universidad Autónoma del Estado de México.
- Floriano, F. Z. (2009). Production of Potato Seedling in vitro Inoculated with Pseudomonas sp. *Terra Latinoamericana*, 207- 217.
- Forero, L. A. (2012). *Medición de la capacidad de Chlorella vulgaris y Scenedesmus acutus para la remoción de cromo de aguas de curtiembre*. Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia.
- García, M. M. (1993). *Gui técnica para la minimización de residuos en curtiembres*. Cochabamba, Bolivia: Agencia Alemana de corporación técnica.
- García, Z. L. (2002). *Caracterización de bacterias en base a su poder detoxificante de cianuro utilizando diferentes sustratos*. Sonora, Mexico: Universidad de Sonora.
- Garrity, G. (2005). Pseudomonadales the Pseudomonas order. En W. Whitman, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (pág. 355). Georgia, USA: Springer Science.
- Giraldo, A. C. (2014). Factores de riesgo para infección por Pseudomonas aeruginosa multi-resistente en un hospital de alta complejidad. *Chilena Infectol*, 393-399.
- González, C. C., Cabezas, G. T., & Anguita, M. M. (2012). *Medios de cultivo en un laboratorio de Microbiología*.
- Gutiérrez, R. T. (2013). *Microbiología Ambiental*. Loja, Ecuador: Universidad Nacional de Loja.
- Helguero, E. t. (2009). *Bacilos Gram negativos no fermentadores: Pseudomonas, Stenotrophomonas, Acinetobacter, Burkholderia*. La Paz, Bolivia: Universidad Mayor de San Andrés.
- Hernández, A. M., & Lorén, L. L. (2017). Pseudomonas aeruginosa. *BIOBIO-INSST (Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo)*, 16.
- Hernández, D. A. (2008). *Bioadsorción de metales pesados mediante uso de biomasa bacteriana aislada de jales mineros*. Atizapán de Zaragoza, México: Instituto Tecnológico y de Estudios superiores de Monterrey.

- Herrera, E. a. (2013). *Fundamentos de Microbiología Predictiva: Aplicaciones teoricas y practicas*. Pamplona- Colombia.
- Ibañez, V. y. (1997). *Evaluacion de los factores de reduccion de DBO y DQO en el liquido residual de pelambre en el curtido de pieles y cueros* . trujillo.
- Jean Marie Meyer, V. A. (2002). Siderophore typing, a powerful tool for the identification of fluorescent and nonfluorescent pseudomonads,. *Applied and Environmental Microbiology*, 2745-2753.
- Larios, F. R. (2009). *Identificación de genes responsables de potencia a carbapenémicos en cepas nosocomiales de Pseudomonas aeruginosa aislada en algunos hospitales de México*. Colima: Universidad de Colima.
- Leon, M. L. (2014). *Caracterización de una cepa de Pseudomonas Fluorescens promotora del crecimiento vegetal*. Uruguay: UdelaR. FC.
- Lira, L. B., Meléndez, R. C., & Sandoval, A. C. (2003). *Atlas de Pruebas bioquimicas para identificar bacterias*. Mexico: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Martinez, L. C. (2012). *Identificacion de bacilos gram negativo no fermentadores para aplicación en celdas de combustible microbianas y en bioremediacion*. Querétaro, Mexico: Centro de investigacion en materiales avanzados.
- Martinez, L. R. (2007). *Pseudomonas Aeruginosa: Aportación al conocimiento de su estructura y al de los mecanismos que contribuyen a su resistencia antimicrobiano*. Barcelona: Universidad de Barcelona .
- Martinez, L. R. (2007). *Pseudomonas aeruginosa: Aportación al conocimiento de su estructura y al mecanismo que contribuyen a su resistencia a los antimicrobinanos*. Barcelona, España: Universidad de Barcelona.
- Mendoza, S. D., & Espinoza, S. G. (2015). *Tratamiento biológico del cromo (vi) con pseudomonas putida en un biorreactor airlift de tubos concéntricos*. Huancayo-Perú: Universidad Nacional del Centro del Perú.
- Merck. (2005). Pseudomonas Agar P. En Merck, *Microbiology Manual Merck* (págs. 395-396). Darmstadt, Germany: Merck KGaA.
- Merck. (2005). Pseudomonas Selective Agar Base (Cetrimide Agar). En Merck, *Microbiology Manual* (págs. 401- 402). Darmstadt, Germany: Merck KGaA.
- Merck. (2005). SIM Medium. En Merck, *Microbiology Manual 12th Edition* (págs. 434-435). Darmstadt, Germany: Merck kCGA.
- Merck. (2005). Triple Sugar Iron Agar. En Merck, *Microbioly Manual* (págs. 471-472). Darmstadt, Germany: Merck KGaA.

- MINAM. (31 de Julio de 2008). Recuperado el 4 de Noviembre de 2014, de MINAM: http://www.minam.gob.pe/calidadambiental/wp-content/uploads/sites/22/2013/10/ds_002_2008_eca_agua.pdf
- Naranjol, E. T., Ratón, T. d., Álvarez, Y. R., & Silva, R. M. (2013). Bioadsorción de plomo (II) por biomasa microbiana seca: Efecto del pH. *Revista Cubana de Química*, 75-81.
- Neogen. (29 de Marzo de 2017). *Neogen Corporation*. Obtenido de Neogen Culture Media: <http://foodsafety.neogen.com/en/simmons-citrate-agar>
- O.P Shukla, U. R. (April - 2006). Bacterial resistance: A tool for remediation of toxic metal Pollution . *Internation Society of Environmental Botanists*, N° 2.
- Otiniano Garcia, M., Collantes, T., & Lurdes. (2007). Biorremediacion de cromo VI de aguas residuales de curtiembres por *Pseudomonas Sp.* y su efecto sobre el ciclo celular de *allium cepa*. *Rev. Med. Vallejana*. Vol. 4 N° 1 , 32-42.
- Panigatti, M. C., & Griffa. (2012). Uso de *Escherichia coli* para biorremediación de efluentes contaminados por cromo VI. En *Avances en Ciencias e Ingeniería*, vol. 3 (págs. 11-24). la serena, CHILE.
- Perea, Y. M., Poveda, J. C., Leal, L. C., & Diaz, A. G. (2014). *Evaluación de un sistema de medio fijo como soporte para una película microbiana capaz de reducir Cr (VI) de lodos residuales de curtiembres*. Cundinamarca, Colombia: Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.
- Pérez, R. M., & Mata, D. C. (2010). *Remoción y reducción de cromo vi en solución por la cáscara de lichee (Litchi chinensis Soon)* . Estado de Hiddalgo - Mexico: Universidad Autónoma de San Luis Potos.
- Pérez, S. G. (2017). *Aislamiento de Bacteriocinas de Pseudomonas aeruginosa multirresistente*. Santa catarina Mártir, Puebla: Fundación Universidad de las Americas Puebla.
- Ponce, E. L. (2007). *Uso de la biorremediacion en aguas mexicanas contaminadas por aguas residuales*. Torreón, Coahuila, México: Univerisdad Autonoma Agraria Antonio Narro.
- Price, P. B., & Sowers, T. (2004). Temperature dependence of metabolic rates for microbial growth, maintenance, and survival . *PNAS Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 4631- 4636.
- Pucci, G. (2017). *Metabolismo bacteriano, identificación y taxonomía*. Trelew: Universidad Nacional de San Juan Bosco II.
- Radillo, J. E. (2013). *Evaluacion de los medios de cultivo para verificar su reproductibilidad y selectividad*. Colima, Mexico: Instituto Tecnologico de Colima.

- Ramirez, C. A. (2002). *Tecnología Ambiental en Nuestro hogar la Nave sideral tierra*. Trujillo, Perú: APLIGRAF S.R.L.
- Ramphal, R. (2016). Infecciones por *Pseudomonas* y microorganismos relacionados . En A. F. Dennis Kasper, *Harrison. Principios de Medicina Interna* (pág. cap. 189). Florida, Estados Unidos : Hill Interamericana Editores, S.A. de C.V.
- Romero, Z. L. (s.f.). *Caracterización de bacterias en base a su poder detoxificante de cianuro utilizando diferentes sustratos*.
- Scaperlini, M., Franzetti, L., & Galli, A. (2004). Development of PCR assay to identify *Pseudomonas fluorescens* and its biotype. *FEMS Microbiology Letters, Volume 236*, 257 - 260 .
- Vanegas, D. M., & Ramirez, M. E. (2016). Correlación del Crecimiento de *Pseudomonas fluorescens* en la Producción de Polihidroxialcanoatos de Cadena Media (PHAMCL) mediante Modelos Primarios de Gompertz, Logístico y Baranyi. *Informacion Tecnologica*, 87-96.
- Villanueva, R. O. (2000). Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. *Revista Latinoamericana de Microbiología* , 131-143.

ANEXOS

Anexo 1: Nefelómetro de MC Farland

Fundamento:

El patrón o la escala de Mc Farland consiste en una serie de tubos herméticamente cerrados, previamente calibrados y con una densidad óptica diferente originada por la aparición de un precipitado de sulfato de bario ($\text{SO}_4 \text{Ba}$) resultante de la reacción entre el cloruro de bario (Cl_2Ba) al 1,175% (0,048 M) y el ácido sulfúrico (H_2SO_4) al 1% (0,36N). Esta turbidez puede interpretarse ópticamente o por métodos espectrofotométricos y cada una de ellas se corresponde a una concentración conocida de bacterias/ml. Para cada cepa bacteriana hay que establecer la equivalencia entre la turbidez de cada tubo y la masa o la concentración de bacterias (cel/ml) que genera una turbidez similar. (Herrera, 2013)

Inconveniente:

Es un método poco preciso, que solo se emplea cuando no hace falta exactitud, ha sido desplazado por los métodos espectrofotométricos.

Conservación:

El estándar de Mc Farland puede ser almacenado hasta por 6 meses en la oscuridad y a temperatura ambiente entre 22° a 25°C. Sin embargo, se recomienda almacenarse a ser posibles en refrigeración.

Cuidados:

Descartar después de 6 meses o antes si su volumen es menor. Antes de cada uso, debe agitarse muy bien usando un shaker, hasta que el precipitado blanco de sulfato de bario se haya disuelto en todo el medio. Para asegurar la densidad del estándar de Mc Farland así preparado puede ser chequeado usando un espectrofotómetro con una celda de cuarzo de 1-cm; para el estándar 0,5 de Mc Farland, la absorbancia a una longitud de onda de 625 nm puede estar entre 0,08a 0,1.

REACTIVOS

Patrón de Mc Farland 5 (0,5 ml de BaCl_2 al 1,175% + 9,5 ml de H_2SO_4 al 1%)

PROCEDIMIENTO

Preparación del inóculo, mantenimiento del cultivo y medida directa del crecimiento:

1. A partir de un cultivo bacteriano (en fase exponencial) preparar una suspensión inicial (Patrón1 –P1) de la cepa seleccionada y ajustarla a una turbidez correspondiente al patrón Mc Farland 0,5, el cual equivale aproximadamente a $1,5 \times 10^8$ bacterias/ml. De este cultivo preparar una dilución 1:10 (Patrón 2 – P2) inoculando 1 ml de P1 en un tubo conteniendo 9 ml de caldo CASO (población final equivalente a $1,5 \times 10^7$ bacterias/ml).
2. A partir de P2 preparar cinco diluciones 1:10 en caldo CASO para obtener los patrones P3, P4, P5 y P6 con unas poblaciones aproximadas a $1,5 \times 10^6$ bacterias/ml; $1,5 \times 10^5$ bacterias/ml; $1,5 \times 10^4$ bacterias/ml; $1,5 \times 10^3$ bacterias/ml, respectivamente.
3. A partir de cada patrón preparar diluciones decimales (1:10) consecutivas en agua peptona estéril de tal forma que la población teórica final sea de $1,5 \times 10^2$ bacterias/ml, según el esquema anexo al final de la guía (ver grafica 1). De la última dilución sembrar en profundidad y por duplicado 0,1 ml para cada patrón. De la dilución anterior sembrar en profundidad y por duplicado 1 ml de cada patrón. Adicionar 15 mL de agar CASO y homogenizar las cajas, llevando a incubar la totalidad de las cajas a una temperatura de $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 – 48 horas.
4. Al finalizar el tiempo de incubación, realizar los cálculos de la población así:

$$N = \frac{\sum c}{n}$$

De esta forma se calcula la población en ufc/mL equivalentes al patrón 1, la cual será correlacionada con el valor inicial de la curva obtenida por espectrofotometría.

5. A partir de cada patrón (P1, P2, P3, P4, P5, P6) determine el valor de la absorbancia a 600nm, de esta forma obtendremos el equivalente en Ab para cada patrón, la cual será correlacionada con el recuento en placa profunda para cada patrón.

6. Con ayuda de Excel obtener una gráfica de dispersión donde ubicaremos en el eje X el valor de la absorbancia y en el eje Y el Log 10 de la población. Posteriormente usando regresión lineal, agregar la línea de tendencia que mejor ajuste tenga según el coeficiente de regresión(R^2) y obtener el valor de la ecuación.

7. Esta ecuación será validada en la práctica posterior y si es fiable se usará para futuros cálculos de población. Solo basta con preparar el inóculo inicial del microorganismo) medir la absorbancia y reemplazar este valor en la variable X de la ecuación. De esta forma obtendremos el valor aproximado de la población en bact/ml

Tabla 15. Escala Mc Farland

Tubo N°	N° Bacterias por mL
1	3×10^8
2	6×10^8
3	9×10^8
4	12×10^9
5	15×10^9
6	18×10^9
7	21×10^9
8	24×10^9
9	27×10^9
10	30×10^9

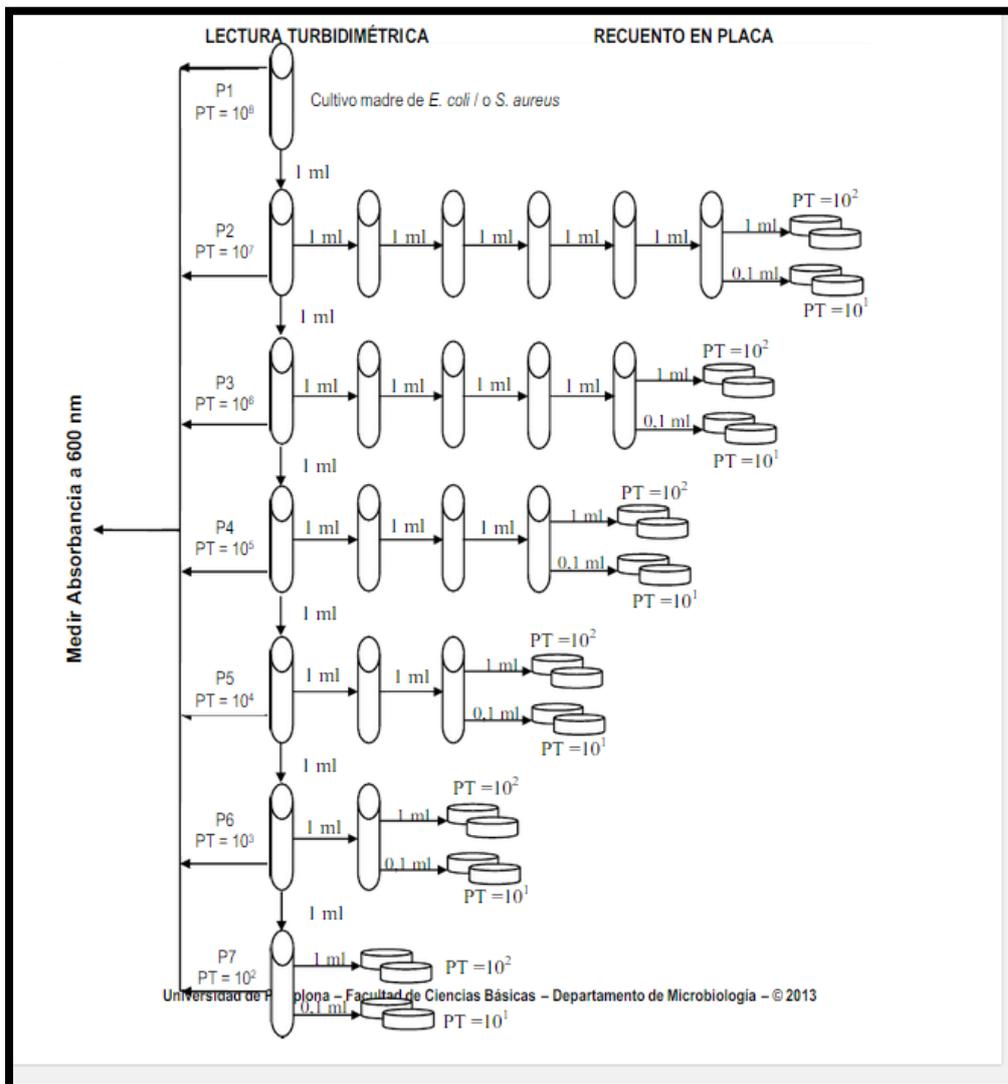


Figura 30. Métodos turbidimétrico y recuento en placa

Anexo 2: Determinación de Cromo Total.
Método colorimétrico de la Difenil Carbazida.

PROCEDIMIENTO:

1. PREPARACIÓN DE CURVA DE CALIBRACIÓN:

1. Tomar 6 fioles volumétricas de 50 mL y enumerarlas.
2. Tomar 6 vasos de 100 mL y numerarlos.
3. Depositar en cada una de los vasos exactamente 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 mL de la solución de trabajo y llevarlas hasta unos 20 mL con agua destilada.
4. Adicionar H_2SO_4 0,20N hasta ajustar la solución hasta un $pH= 1 \pm 0.30$.
5. Transfiera las soluciones a las fioles numeradas correspondientes.
6. Adicionar 2 mL de la solución de difenilcarbazida. Aforar a la marca.
7. Dejar reposar de 5 a 10 minutos para desarrollar el color.
8. Leer la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm.
9. Con los datos de Absorbancia y Concentración, construir la respectiva curva de Calibración para Cromo Hexavalente.

2. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA:

SÓLO PARA EL CROMO HEXAVALENTE DIRECTO :

1. Filtrar unos 50 mL de muestra acidificada directa .
2. Tomar una muestra conveniente en vaso de precipitación de 100 mL.
3. Ajustar el pH a 1 ± 0.3 con H_2SO_4 0.20 N
4. Transferir a una fiola de 50 mL y llevarla a aproximadamente 40 mL .
5. Adicionar 2 mL de difenilcarbazida. Aforar a la marca.
6. Dejar reposar 5 min y leer su respectiva absorbancia.
7. Con el valor leído determinar las ppm Cr^{6+} de la gráfica.
8. Determinar la concentración real de la muestra.

DIGESTIÓN ACIDA PARA CROMO TOTAL:

1. Tome un volumen determinado (50 mL) de muestra en un vaso volumétrico y acidifique al anaranjado de metilo con $H_2SO_4(cc)$ y a continuación adicione 5 mL de HNO_3 cc y 2 mL de H_2O_2 al 30%.
2. Evaporar hasta unos 15 mL sin perder muestra por salpicaduras.

3. Adicionar 10 ml de H_2SO_4 cc y evaporar hasta la aparición de humos blancos densos de SO_3 .
4. Si la solución todavía no se clarifica, adicione 10 mL de HNO_3 cc y repita le evaporación de SO_3 . Remueva todo el HNO_3 observando que no hay evidencia de humo oscuro.
5. Enfríe y diluya hasta aproximadamente 50 mL con agua destilada. Caliente hasta casi ebullición para disolver las sales.
6. Filtrar recogiendo el filtrado en una fiola volumétrica de 50 mL, lavando el papel filtro convenientemente.
7. Enfríe y aforar a la marca.

OXIDACIÓN DEL CROMO TRIVALENTE :

8. Pipetear una porción de muestra digerida en un matraz de 125 mL.
9. Usando anaranjado de metilo adicionar NH_4OH hasta coloración amarilla.
10. Adicioanar H_2SO_4 gota a gota hasta que nuevamente se torne ácida y adicionarle 1 mL .
11. Ajustar el volumen hasta aproximadamente 40 mL y calentar a ebullición.
12. Gota a gota KMnO_4 oxidar completamente al Cromo trivalente.
13. Hervir la solución y adicionar AZIDA hasta la desaparición del color del KMnO_4 .
14. Enfriar y adicionar 5 gotas de H_3PO_4 .

NOTA : Si se sospecha la interferencia de Molibdeno, Vanadio, Hierro o Cobre , éstos deberán ser removidos con Cupferrón.

TRATAMIENTO DE LA MUESTRA :

1. Tomar una alícuota de la muestra digerida y tratarla igualmente como se hizo con las soluciones patrón.
2. Registrar su absorbancia y leer en la Curva de calibración.
3. Realizar los cálculos para expresarlo en función de la muestra directa.

VII. CÁLCULOS :

$$\text{ppm Cr}^{6+} \text{ total} = (\text{ppm Cr}^{6+} \text{ total de gráfica}) * (50/ \text{mL alícuota tomada}).$$

Anexo 3: Modelo de Monod

En una reacción biológica son varios los sustratos que participan en ella, las bacterias crecen y utilizan muchísimas enzimas para llevar a cabo la reacción biológica deseada. Si se quisiera describir detalladamente las reacciones deberíamos usar un modelo segregado y estructurado, lo cual es muy complejo y escapa a este capítulo que debe considerarse como introductorio a la temática de biorreactores. Monod en 1942 desarrolló una ecuación muy simple para representar los procesos biológicos que funciona en general muy bien. Para ello asumió que, si bien pueden existir muchos sustratos, uno de ellos será el limitante. En este modelo se asume que la producción de biomasa depende exclusivamente de la concentración de este sustrato limitante. Para una reacción biológica del tipo $\alpha S \rightarrow \gamma X$, la velocidad de crecimiento de biomasa puede representarse como sigue:

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{S + K_s}$$

Donde:

μ_{\max} = velocidad específica de crecimiento máxima, h⁻¹ K_s =constante de saturación, g/l S =concentración de sustrato limitante, g/l

Como puede observarse la ecuación, que es semiempírica, es análoga a la de Michaelis-Menten. En efecto se deriva de suponer que una única enzima con una cinética del tipo Michaelis-Menten es la responsable del consumo de S y conjuntamente que la cantidad de enzima o bien su actividad catalítica es lo suficientemente baja como para controlar el crecimiento (pueden haber otras reacciones enzimáticas, pero sólo controla una de ellas).

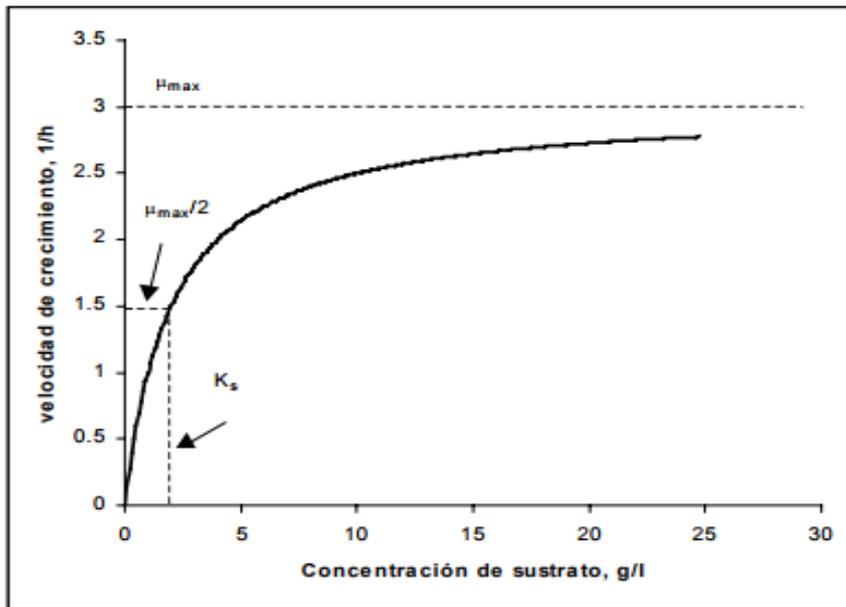


Figura 31: Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad de crecimiento bacteriano

Cuando $s \rightarrow \infty$, la velocidad $\mu \rightarrow \mu_{\max}$, cuando $s \rightarrow 0$, $\mu \rightarrow 0$ y cuando $s = K_s$, $\mu = \mu_{\max}/2$. De acuerdo a la ecuación (8.5): $s \mu = Y_{xs} r$, entonces:

$$r_s = Y_{xs} \mu$$

$$r_s = Y_{xs} \mu_{\max} s / (s + K_s)$$

En forma análoga la velocidad de un producto P puede expresarse como:

$$r_P = Y_{xp} \mu_{\max} s / (s + K_s)$$

Anexo 4: Determinación de concentraciones para el tratamiento

Para hallar determinar la cantidad de las concentraciones se empleó la siguiente formula:

$$\frac{(\text{concentracion de bacterias a utilizar}) * (\text{cantidad deseada de inoculo a preparar})}{\text{N}^\circ \text{ de bacterias de Mc farland a utilizar}}$$

- Para una concentración de 3×10^8 se realizó el reemplazo de la ecuación:

$$= \frac{(3 \times 10^8 \text{ bact/mL}) * (500 \text{ mL})}{12 \times 10^9 \text{ bact/mL}}$$

$$= 12.5 \text{ mL de inoculo para una concentración de } 3 \times 10^8 \text{ bact/mL}$$

- Para una concentración de 3×10^6 se realizó el reemplazo de la ecuación:

$$= \frac{(3 \times 10^6 \text{ bact/mL}) * (500 \text{ mL})}{12 \times 10^9 \text{ bact/mL}}$$

$$= 0.125 \text{ mL de inoculo para una concentración de } 3 \times 10^6 \text{ bact/mL}$$

- Para una concentración de 3×10^4 se realizó el reemplazo de la ecuación:

$$= \frac{(3 \times 10^4 \text{ bact/mL}) * (500 \text{ mL})}{12 \times 10^9 \text{ bact/mL}}$$

$$= 0.00125 \text{ mL de inoculo para una concentración de } 3 \times 10^4 \text{ bact/mL}$$

Anexo 5: Curva de calibración de biomasa

PROCEDIMIENTO:

Preparación de inóculo:

1. En un matraz de 500mL de capacidad, se colocó: 5 mL de solución de glucosa al 25%, 25 mL de Extracto de carne al 30%, 0.125 mL de solución de CaCl al 32%, luego se afora a 200 ml con agua destilada.
2. Luego se diluyó todos los nutrientes y se llevó a la autoclave para su esterilización
3. Después de que el medio se enfrió se agregó 3 asadas de bacteria *Pseudomonas sp*
4. Posteriormente se lleva a la incubadora a 37°C por 18 horas

Preparación de método gravimétrico - Peso seco

1. Se coloca 5 ml del inóculo preparado y se colocaron en tubos de ensayo
2. se llevó a centrifugar a 5000 rpm por un periodo de 10 minutos.
3. Luego se eliminó el sobrenadante y quedó un pellet
4. Se Agregó agua destilada y se pasó por el agitador vortex para homogenizar
5. Luego se volvió a llevar a la centrifuga a 5000 rpm por un periodo de 10 min
6. Se eliminó el sobrenadante y el pellet se vació en un vaso precipitado de 100 ml
7. Se repitió el procedimiento hasta acabar los 200 ml de inóculo preparado.
8. Luego se procedió a realizar diluciones (1/2; 1/4; 1/16; 1/32)

Tabla 16. Cantidades para preparación de diluciones para biomasa

Diluciones	Cant. Muestra (mL)	Cant. Agua (mL)
1/2	2.5	2.5
1/4	1.25	3.75
1/16	0.31	4.69
1/32	0.16	4.84

9. Posteriormente las diluciones se pasaron por el agitador vortex para homogenizar.
10. Se llevaron a medir por espectrofotómetro y se leyó la absorbancia a 600nm
11. Luego se realizó 4 capachos de papel aluminio y se pesó en la balanza analítica.
12. Se agregó las muestras diluidas en cada capacho.
13. Y se llevó a la estufa a una temperatura 105°C por un promedio de 12 horas
14. Luego se extrajo los capachos y se colocaron en un desecador para transportar a la balanza analítica
15. Se pesó los capachos y se anotó el peso

Tabla 17. Valores de peso seco y absorbancia para curva de biomasa

Dilución	Peso de capacho			Absorbancia
	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Peso seco (g)	
1/2	0.1662	0.1687	0.0025	0.301
1/4	0.1667	0.1681	0.0014	0.141
1/16	0.1718	0.1725	0.0007	0.037
1/32	0.169	0.1694	0.0004	0.024

Nota: para hallar el peso seco se realiza la siguiente formula

$$Peso\ Seco = Peso\ final - peso\ Inicial$$

16. Al terminar de hallar los valores de peso seco y Absorbancia se realizó una gráfica de peso seco vs Absorbancia.

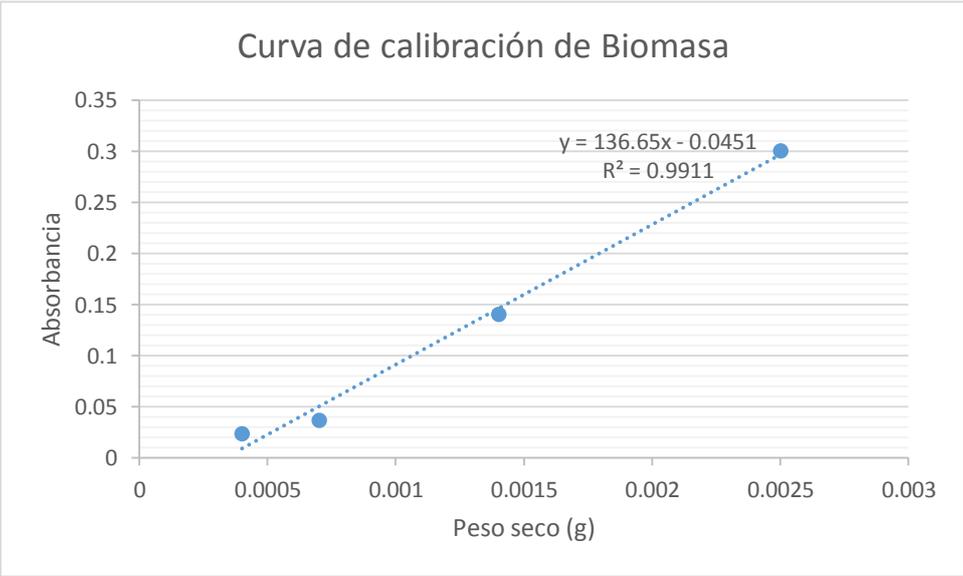


Figura 32: Curva de Calibración de biomasa

Anexo 6: CURVA DE CALIBRACIÓN DE GLUCOSA

Preparación de curva de calibración de glucosa por DNS

1. Se preparó 20ml de una solución madre de 2.6 g/L de glucosa
2. En base a la solución madre se preparó diluciones de 2.6, 2.2, 1.8, 1.4, 1.0, 0.6 g/L
3. Luego se procedió a realizar diluciones (1/2; 1/4; 1/16; 1/32)

Tabla 18. Cantidades para preparación de diluciones de glucosa

Concentraciones (g/L)	Cant. de muestra (mL)	Cant. de Agua destilada
2.6	5	0
2.2	4.2	0.8
1.8	3.46	1.54
1.4	2.69	2.31
1.0	1.92	3.08
0.6	1.15	3.85

4. Se realizó la determinación de azúcares reductores mediante DNS: Se colocaron 0.5 mL de la dilución en cada tubo de ensayo más 0.5 mL de reactivo DNS.
5. Los tubos de ensayo se colocaron en baño de agua a 100°C por 5 min, después se colocaron en un recipiente con cubos de hielo por 5 min.
6. Posteriormente se agregó 5 ml de agua destilada en cada tubo de ensayo y se colocaron en el agitador vortex para homogenizar la muestra.
7. Se dejó reposar por 15 min y se realizó la lectura en el espectrofotómetro a 540 nm.

Tabla 19. Valores de Absorbancia de las distintas concentraciones de glucosa

Glucosa(g/L)	Absorbancia
2.6	1.638
2.2	1.371
1.8	1.032
1.4	0.859
1	0.551
0.6	0.366

8. Al terminar de hallar los valores Absorbancia se realizó una gráfica de Glucosa vs Absorbancia.

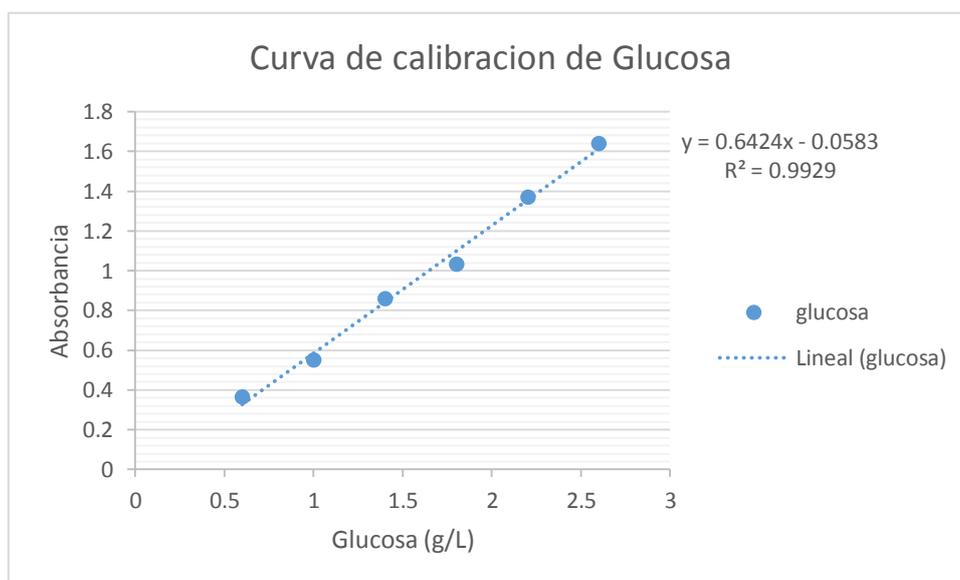


Figura 33: Curva de Calibración de Glucosa

Anexo 7: Resultados de cromo VI



INFORME DE ANÁLISIS

SOLICITANTE	: KATHLEEN XIOMARA MIRANDA PAZ
MUESTRA	: AGUA RESIDUAL
PROCEDENCIA	: Curtiembre del Porvenir
FECHA DE INGRESO	: 17 DE SETIEMBRE DEL 2018
MUESTRA RECIBIDA EN LABORATORIO	

TIEMPO 0 Cr ⁶ mg/L	TRATAMIENTO 1	1R	1,6079
		2R	1,6079
		3R	1,5942
	TRATAMIENTO 2	1R	1,6011
		2R	1,6079
		3R	1,5874
	TRATAMIENTO 3	1R	1,5942
		2R	1,5942
		3R	1,5805

TIEMPO 1 Cr ⁶ mg/L	TRATAMIENTO 1	1R	1,5668
		2R	1,5737
		3R	1,5805
	TRATAMIENTO 2	1R	1,5600
		2R	1,5532
		3R	1,5532
	TRATAMIENTO 3	1R	1,5668
		2R	1,5532
		3R	1,5600

TIEMPO 2 Cr ⁶ mg/L	TRATAMIENTO 1	1R	1,5600
		2R	1,5395
		3R	1,5532
	TRATAMIENTO 2	1R	1,5463
		2R	1,5463
		3R	1,5532
	TRATAMIENTO 3	1R	1,5326
		2R	1,5395
		3R	1,5326

LASACI
 DIRECCION
 Centro de Servicios a la Comunidad e Investigacion
 Universidad Nacional de Trujillo
 R. CIP. 122585

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO

LABORATORIO DE SERVICIOS A LA COMUNIDAD E INVESTIGACION



LASACI

TIEMPO 3 Cr ⁶ mg/L	TRATAMIENTO 1	1R	1,5395
		2R	1,5395
		3R	1,5258
	TRATAMIENTO 2	1R	1,5326
		2R	1,5258
		3R	1,5258
	TRATAMIENTO 3	1R	1,5395
		2R	1,5326
		3R	1,5395

TIEMPO 4 Cr ⁶ mg/L	TRATAMIENTO 1	1R	1,5189
		2R	1,5326
		3R	1,5258
	TRATAMIENTO 2	1R	1,5258
		2R	1,5121
		3R	1,5189
	TRATAMIENTO 3	1R	1,5189
		2R	1,5053
		3R	1,5121

TIEMPO 5 Cr ⁶ mg/L	TRATAMIENTO 1	1R	1,4984
		2R	1,5121
		3R	1,5053
	TRATAMIENTO 2	1R	1,5053
		2R	1,5053
		3R	1,4984
	TRATAMIENTO 3	1R	1,4984
		2R	1,4916
		3R	1,4984



AGUAS - SUELOS - ALIMENTOS - MINERALES - ACEITE - CARBON - CAL

FACULTAD DE INGENIERIA QUIMICA



TIEMPO 6 Cr ⁶ mg/L	TRATAMIENTO 1	1R	1,4916
		2R	1,4847
		3R	1,4847
	TRATAMIENTO 2	1R	1,4711
		2R	1,4779
		3R	1,4642
	TRATAMIENTO 3	1R	1,4642
		2R	1,4711
		3R	1,4574

TIEMPO 7 Cr ⁶ mg/L	TRATAMIENTO 1	1R	1,4505
		2R	1,4574
		3R	1,4505
	TRATAMIENTO 2	1R	1,4574
		2R	1,4437
		3R	1,4368
	TRATAMIENTO 3	1R	1,4232
		2R	1,4300
		3R	1,4368

TIEMPO 8 Cr ⁶ mg/L	TRATAMIENTO 1	1R	1,4163
		2R	1,4026
		3R	1,4026
	TRATAMIENTO 2	1R	1,4095
		2R	1,4026
		3R	1,3889
	TRATAMIENTO 3	1R	1,3958
		2R	1,4026
		3R	1,3889



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO

LABORATORIO DE SERVICIOS A LA COMUNIDAD E INVESTIGACION



LASACI

TIEMPO 9 Cr ⁶ mg/L	TRATAMIENTO 1	1R	1,4026
		2R	1,3958
		3R	1,3821
	TRATAMIENTO 2	1R	1,3958
		2R	1,3821
		3R	1,3753
	TRATAMIENTO 3	1R	1,3889
		2R	1,3958
		3R	1,3821

TIEMPO 10 Cr ⁶ mg/L	TRATAMIENTO 1	1R	1,3753
		2R	1,3547
		3R	1,3342
	TRATAMIENTO 2	1R	1,3821
		2R	1,3616
		3R	1,3547
	TRATAMIENTO 3	1R	1,3684
		2R	1,3547
		3R	1,3479

MUESTRA	BLANCO	Cr ⁶ mg/L	1,6147
---------	--------	----------------------	--------

TRUJILLO, 15 DE OCTUBRE DEL 2018



AGUAS - SUELOS - ALIMENTOS - MINERALES - ACEITE - CARBON - CAL

FACULTAD DE INGENIERIA QUIMICA

☎ 949959632 / 942844957