

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS, BIOQUÍMICAS Y BIOTECNOLÓGICAS

PROGRAMA PROFESIONAL DE INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA



**“BIODEPURACIÓN PARCIAL DE ARSÉNICO DE AGUAS
CONTAMINADAS USANDO BIORREACTOR DE LECHO MÓVIL
(MBBR) CON CARGA BACTERIANA EXTREMÓFILA - PUNTA DE
BOMBÓN, AREQUIPA 2013”**

Trabajo de Tesis presentado por:

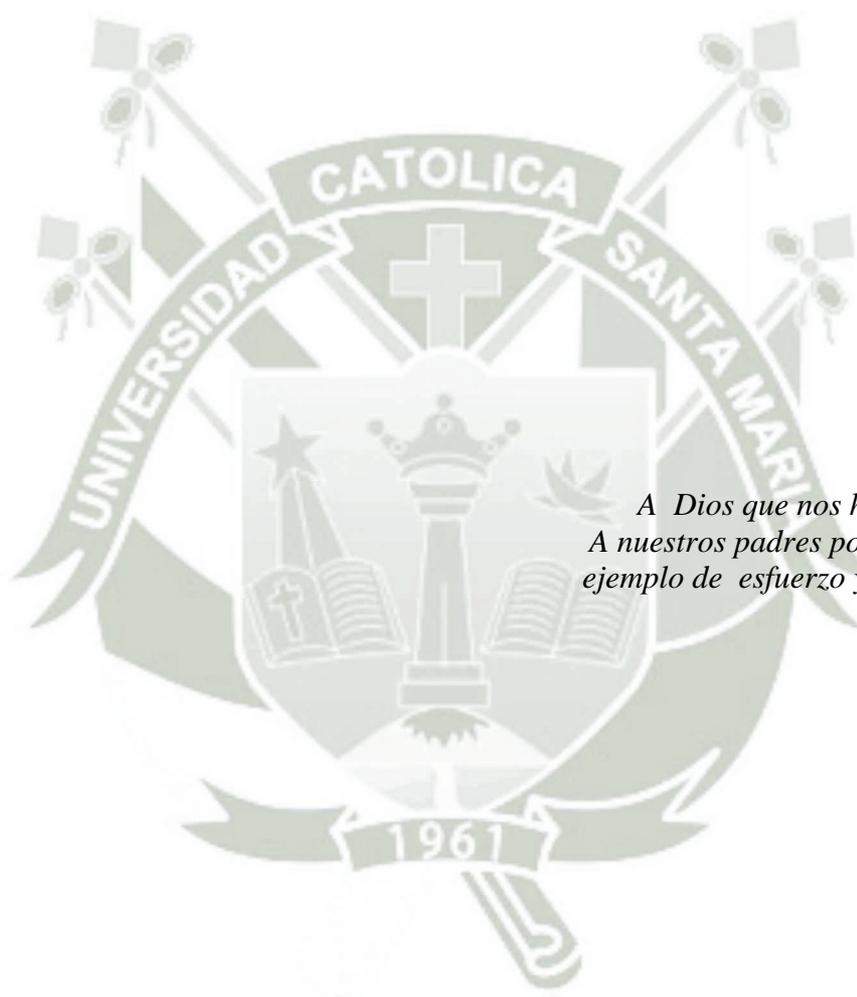
REBAZA PEÑAFIEL, Rosmary

RODRÍGUEZ RIVERA, Begonia Lucía

Asesor: Ing. Javier Roque Rodríguez

AREQUIPA – PERÚ

2014



*A Dios que nos ha dado todo
A nuestros padres por haber sido
ejemplo de esfuerzo y superación*

AGRADECIMIENTOS

A nuestros padres: Rosa Rivera Ballón y Buenaventura Jesús Rodríguez Ampuero, Rosa Peñafiel Salazar y Cesar Rebaza Rado; sin su ayuda nos hubiera sido muy difícil concluir esta importante etapa de nuestra vida. A nuestras familias por su confianza y apoyo incondicional

A nuestro asesor al Mg. Francisco Javier Roque Rodríguez por su tiempo, orientación, consejo y sugerencias, por habernos acompañado en este proceso de aprendizaje

A la Universidad Católica Santa María por habernos ofrecido la oportunidad de crecer. En especial al Programa Profesional de Ingeniería Biotecnológica y a nuestros maestros a quienes les debemos gran parte de nuestra formación académica.

A la empresa SEDAPAR. S.A. por habernos apoyado en la caracterización de agua subterránea de Punta de Bombón así como en la toma de muestras.

A nuestros jurados, por su amabilidad, buena disposición, paciencia y por el tiempo que nos dedicaron para que este trabajo culminara exitosamente.

A nuestros amigos, por habernos acompañado a lo largo de toda la carrera haciendo que todo sea inolvidable y feliz.

Eternamente agradecidas

Begonia Lucía Rodríguez Rivera
Rosmary Rebaza Peñafiel

ABREVIATURAS

AES-ICP: Espectroscopia de emisión atómica por plasma de acoplamiento inductivo

ASTM: Sociedad Americana para Pruebas y Materiales

ANOVA: análisis de varianza

EDTA: Acido tetracético de etilendiamina

CND: Conductividad

ECA: Estándar de Calidad Ambiental

ICP: Plasma de acoplamiento inductivo

INDECOPI: Instituto Nacional de Defensa de la competencia y de la protección de la Propiedad Intelectual.

MBBR: Reactor de biopelículas de lecho móvil

N: Normalidad

NTP: Normas Técnicas Peruanas

NTU: Unidades nefelométricas de turbidez

LMP: Límite máximo permisible

OES-ICP: Espectroscopia de emisión óptica por plasma de acoplamiento inductivo

PEHD: Polietileno de alta densidad

STD: Sólidos totales disueltos

SUNASS: Superintendencia Nacional de Servicios de Saneamiento

TSA: Agar soya tripticasa

TSI: Prueba triple azúcar hierro

USEPA: US Environmental Protection Agency

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE CONTENIDO.....	5
ÍNDICE DE TABLAS.....	10
CAPÍTULO I.....	16
INTRODUCCIÓN.....	16
1.1. HIPÓTESIS.....	18
1.2. OBJETIVOS:.....	19
1.2.1. General.....	19
1.2.2. Específicos:.....	19
1.3. VARIABLES DE ESTUDIO:.....	20
1.4. JUSTIFICACIÓN:.....	22
CAPÍTULO II.....	23
MARCO TEÓRICO.....	23
2.1. CONTAMINACIÓN DEL AGUA.....	23
2.2. CONTAMINANTES ELEMENTALES.....	23
2.3. ARSÉNICO.....	23
2.3.1. El Arsénico en el medio ambiente.....	25
2.3.2. Toxicidad y efectos a la salud.....	25
2.3.3. Usos.....	28
2.4. LEGISLACIÓN AMBIENTAL.....	28
2.5. PROCESOS BIOLÓGICOS PARA EL TRATAMIENTO DE AGUAS CONTAMINADAS CON ARSÉNICO.....	29
2.6. RESPUESTAS MICROBIANAS A AMBIENTES CON ARSÉNICO.....	30
2.7. REACTOR DE BIOPELÍCULA DE LECHO MÓVIL (MBBR).....	30
2.8. BIOPELÍCULAS MICROBIANAS.....	33
2.9. MICROORGANISMOS RESISTENTES A ARSÉNICO.....	33
2.9.1. Bacillus SPP.....	34
2.9.2. Pseudomonas SPP.....	34
2.9.3. Pleisomonas SPP.....	35
2.10. AGUAS SUBTERRÁNEAS.....	36
2.11. DISTRITO DE PUNTA DE BOMBÓN Y SU CONTAMINACIÓN POR ARSÉNICO.....	38

CAPÍTULO III	42
MATERIALES Y MÉTODOS	42
3.1. LUGAR DE LA INVESTIGACIÓN	42
3.2. MATERIALES UTILIZADOS EN LA INVESTIGACIÓN	43
3.2.1. Material biológico.....	43
3.2.2. Instrumental de Vidrio.....	43
3.2.3. Equipos y Aparatos	43
3.2.4. Reactivos.....	44
3.2.5. Otros	45
3.3. MÉTODOS	46
3.3.1. Obtención de muestras del geiser coalaque (MG).....	46
3.3.2. Caracterización de la muestra del geiser coalaque (MG-1) en Arsénico	47
3.3.3. Aislamiento de microorganismos de la muestra del geiser coalaque (MG-2).....	47
3.3.4. Adaptación de las muestras del geiser coalaque (MG-2) a Arsénico (III) en medio sólido.	49
3.3.5. Identificación de las cepas adaptadas a AS (III)	50
3.3.6. Obtención de la muestra proveniente a la punta de bombón (MP).....	57
3.3.7. Caracterización Físicoquímica de aguas crudas de la muestra de aguas subterráneas de punta de bombón (MP)	58
3.3.8. Diseño del sistema MBBR para biodepuración de Arsénico en agua	63
3.3.9. Evaluación del sistema.....	65
3.3.10. Determinación de la cinética de cultivos resistentes.....	65
3.3.11. Obtención de la biomasa.....	66
3.3.12. Caracterización físicoquímica de las aguas biodepuradas a la salida del sistema MBBR.	66
3.3.13. Análisis Estadístico	67
CAPÍTULO IV	69
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	69
4.1. OBTENCIÓN DE MUESTRAS DEL GEISER COALAQUE (MG)	69
4.2. CARACTERIZACIÓN DE LA MUESTRA DEL GEISER COALAQUE (MG-1) EN ARSÉNICO	70
4.3. AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS DE LA MUESTRA DEL GEISER COALAQUE (MG-2)	71
4.4. ADAPTACIÓN DE LAS MUESTRAS DEL GEISER COALAQUE (MG-2) A ARSENICO (III) EN MEDIO SOLIDO	73

4.5.	IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS ADAPTADAS A AS(III)	78
4.6.	RESUMEN DE LA IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS AISLADAS	89
4.7.	OBTENCIÓN DE LA MUESTRA PROVENIENTE A LA PUNTA DE BOMBÓN (MP)	103
4.8.	CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE AGUAS CRUDAS DE LA MUESTRA DE AGUAS SUBTERRANEAS DE PUNTA DE BOMBON (MP).....	106
4.9.	DISEÑO DEL SISTEMA MBBR PARA REDUCCIÓN DE CONCENTRACIÓN DE ARSENICO EN AGUA.....	108
4.10.	EVALUACION DEL SISTEMA.....	110
4.11.	DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA DE CULTIVOS RESISTENTES	115
4.12.	OBTENCIÓN DE LA BIOMASA.....	116
4.13.	CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LAS AGUAS BIODEPURDAS EN ARSENICO A LA SALIDA DEL SISTEMA MBBR.	118
	CAPÍTULO V.....	124
	CONCLUSIONES.....	124
	CAPÍTULO VI.....	125
	RECOMENDACIONES.....	125
74.	Ramos R, Sepulveda R., Villalobos M., El agua en el medio ambiente: muestreo y análisis, Mexico :Plaza y Valdes S.A;2003	132
	ANEXOS	135
	ANEXO N°1. LÍMITES MÁXIMOS PERMISIBLES DE AGUA PARA CONSUMO HUMANO	135
	ANEXO N°2. GALERÍA DE FOTOS DE LAS PRUEBAS DE ADAPTABILIDAD	137
	ANEXO N°3.COMPOSICIÓN DE LOS MEDIOS UTILIZADOS.....	139
	ANEXO N°4. CERTIFICACIÓN.....	143
	ANEXO N° 5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	146

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquema del biorreactor de lecho móvil	30
Figura 2: Balón de Meinzer.....	34
Figura 3: Distribución del agua subterránea	37
Figura 4: Comparación de los niveles de Arsénico entre Julio - Octubre 2009, Noviembre 2010 y Noviembre 2011	40
Figura 5: Concentración de Arsénico en la cuenca del Rio Tambo.....	40
Figura 6: Configuración experimental del sistema	65
Figura 7: Muestra fisicoquímica y microbiológica del geiser Coalaque.	69
Figura 8: Muestreo en el geiser Coalaque.....	70
Figura 9: Muestra microbiológica (MG-2) y 6 diluciones preparadas.....	71
Figura 10: Siembra por triplicado de las diluciones D0, D2, D4, D6.....	72
Figura 11: Características morfológicas de las colonias	73
Figura 12: Características morfológicas de las colonias	73
Figura 13: Coloración de GRAM de las cepas nativas aisladas.	80
Figura 14: Coloración de Wirtz-Conklin	80
Figura 15: Prueba de la catalasa con resultado positivo	82
Figura 16: Prueba de la oxidasa positiva.....	83
Figura 17: Prueba de la ureasa.	83
Figura 18: Resultados de la prueba del TSI,	84
Figura 19: Ilustración de la prueba O/F.	84
Figura 20: Prueba de reducción de nitratos.....	85
Figura 21: Prueba Mc Conkey.	85
Figura 22: Resultados crecimiento de microorganismos en caldo tioglicolato.....	86

Figura 23: Resultados para la prueba de leche Litmus	86
Figura 24: Resultados de prueba gelatina.	87
Figura 25: Prueba de motilidad por gota invertida	87
Figura 26: Prueba Indol.....	88
Figura 27: Resultados Manitol Salado.	88
Figura 28: Punto de muestreo del pozo de Punta de Bombón	104
Figura 29: Transporte de muestra del pozo de Punta de Bombón	105
Figura 30: Refrigerador para el almacenamiento de muestras.....	105
Figura 31: Sistema configurado para la reducción de la concentración de arsénico en agua.	109
Figura 32: Curva de reducción de Arsénico en agua	112
Figura 33: Curvas de Crecimiento bacteriano.....	115
Figura 34: Soportes PEDH con formación de biopelículas	117
Figura 35: Semillero para la producción de biopelícula	118
Figura 36: Grafica de caja bigotes	148

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Variables independientes	20
Tabla 2: Variables dependientes	21
Tabla 3: Población en riesgo de Contaminación por arsénico en agua.....	27
Tabla 4: Diluciones Obtenidas para la siembra por dilución	48
Tabla 5: Medios Evaluados en la adaptación.....	50
Tabla 6: Categorías para la evaluación cualitativa de la adaptación a arsenito de sodio (As III).....	50
Tabla 7: Morfología de Colonias Resembradas	72
Tabla 8: Crecimiento e las Colonias a los 3 Días de Siembra	75
Tabla 9: Crecimiento e las Colonias a los 7 días de Siembra	75
Tabla 10: Crecimiento e las Colonias a los 14 días de Siembra	76
Tabla 11: Crecimiento e las Colonias a los 21 días de Siembra	77
Tabla 12: Caracterización microscópica de cepas puras.....	79
Tabla 13: Morfología macroscópica de las cepas puras.....	81
Tabla 14: Resultados de la hemólisis	82
Tabla 15: Resultados de la prueba de la catalasa	82
Tabla 16: Resumen de las principales pruebas bioquímicas para la identificación de las especies microbiológicas gram positivas.....	101
Tabla 17: Resumen de las principales pruebas bioquímicas para la identificación de las especies gram negativas.....	102
Tabla 18: Concentración de arsénico inicial corregida de la muestra (MP).	106
Tabla 19: Calidad fisicoquímica del agua de Punta de Bombón antes del tratamiento.....	107
Tabla 20: Concentración de arsénico en agua a diferentes tiempos de retención	110
Tabla 21: Arsénico reducido del agua por tiempos de retención.....	111

Tabla 22: Concentraciones de Arsénico corregidas para agua subterránea de Punta de Bombón 112

Tabla 23: Fases de crecimiento bacteriano. 116

Tabla 24: Comparación de la calidad fisicoquímica del agua de Punta de Bombón antes y después del tratamiento..... 120

ANEXOS

Tabla 25: Límites máximos permisibles de parámetros de calidad Organoléptica 135

Tabla 26: Límites máximos permisibles de parámetros químicos Inorgánicos y orgánicos 136

Tabla 27: Galería de fotos de la de la prueba de resistencia en placa a los 3 días de siembra. 137

Tabla 28: Descriptivos para cada tiempo de retención en el sistema MBBR 146

Tabla 29: Prueba de ANOVA para la concentración de arsénico en agua a diferentes tiempos de retención..... 146

Tabla 30: Comparación Múltiple entre tiempos de retención en el sistema 147

Tabla 31: HDS Tukey 147

Tabla 32: Estadístico número de muestras, media, desviación estándar y error típico para los parámetros evaluados respecto a la calidad del agua. 148

Tabla 33: Prueba de test de hipótesis para los parámetros monitoreados de calidad de agua antes y después de 24 horas de tratamiento 149

RESUMEN

En el distrito de Punta de Bombón la contaminación del agua subterránea con arsénico es un importante problema de salud pública. En esta investigación se probó el sistema MBBR en la reducción de la concentración de arsénico en agua subterránea de dicho distrito destinada para consumo humano.

Se usó 1 consorcio CAs1 y 3 cepas puras(CAs2,CAs3,CAs5) provenientes del geiser de distrito de Coalaque, Provincia General Sánchez Cerro, departamento de Moquegua utilizando medio TSA y Plate Count suplementados con arsenito de sodio.

Se realizó pruebas de adaptación a diferentes concentraciones de arsenito de sodio, se evaluaron a los 3,7,14 y 21 días usando ocho medios M1,M2,M3,M4, M5,M6,M7,M8, en los cuales se disminuyó la concentración de medio Plate Count y se aumentó la concentración de Arsenito de sodio (AsIII); tras realizar los estudios de las cuatro cepas estudiadas se determinó que la cepa más resistente a altas concentraciones de arsénico bajo los parámetros utilizados fue la cepa CAs3 con una, seguida por la CAs5 y la CAs1 y finalmente la cepa CAs2, según la evaluación de la concentración inhibitoria mínima.

Se usó la morfología y pruebas bioquímicas para la identificación de estos microorganismos los cuales se reconocieron como : el consorcio CAs1 las cepas *Bacillus Subtilis*, *Bacillus Lentus*, *Bacillus Cereus*, la cepa CAs2 se

identificó como *Pleisomona Spp.*, la cepa CAs3 se identificó como *Bacillus Megaterium*, la cepa CAs5 se identificó como *Pseudomona Spp.* Se analizó la cinética de crecimiento de las cepas, la cepa CAs2 y el consorcio CAs1 requieren mayor tiempo para iniciar su fase exponencial mientras que las cepas CAs3 y CAs5 entran en fase exponencial rápidamente, asimismo estas cepas son las que presentaron mayor adaptabilidad al arsenito de sodio, mostrando así su afinidad por el arsénico.

Se caracterizó fisicoquímicamente el agua subterránea obtenida del pozo de SEDAPAR del distrito de la Punta de Bombón, perteneciente a la provincia de Islay del departamento de Arequipa., asimismo se evaluó la calidad del agua tras 24 horas de tratamiento.

Nuestro estudio llevó a cabo la evaluación de una alternativa para biodepurar arsénico, se diseñó un sistema MBBR utilizando soportes de polietileno de alta densidad en los que se adhiere el consorcio de microorganismos resistentes a arsénico (CAs1, CAs2, CAs3, CAs5) y se trató el agua proveniente de la Punta de Bombón logrando un porcentaje de biodepuración de 16,08 % arsénico en 24 horas, a las 10 horas 10,40% y a las 5 horas, 8,32 %. Se encontró diferencia significativa entre el agua sin tratamiento y el agua tratada luego de 24 horas, pero no se obtuvo un resultado por debajo del LMP de arsénico en agua para consumo humano.

Por último se concluye que las cepas *Bacillus Subtilis*, *Bacillus Lentus*, *Bacillus Cereus*, *Pleisomona spp*, *Bacillus Megaterium* y *Pseudomona spp*, provenientes del geiser Coalaque fueron altamente adaptables a las concentraciones de arsénico y presentaron actividad biodepuradora parcial usando el sistema MBBR bajo las condiciones establecidas en el presente trabajo, sin embargo este sistema requiere mayor tiempo de tratamiento, por lo cual no es aconsejable para tratamientos de potabilización; pudiendo ser una alternativa para el tratamiento de arsénico en efluentes o aguas residuales entre otros.

Palabras Clave: *arsénico, aguas subterráneas, biodepuración parcial.*

ABSTRACT

In the district of Punta de Bombon contamination of groundwater with arsenic is a major public health problem. In this research the MBBR system was tested in the groundwater biodepuration intended for human consumption.

A consortium CAs1 and 3 pure strains (CAs2, CAs3, and CAs5) were used from the geyser Coalaque district, province General Sánchez Cerro, Moquegua; using TSA and Plate Count medium supplied with sodium arsenite.

Adaptation tests to different concentrations of sodium arsenite, were evaluated at 3,7,14 and 21 days using eight mediums M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, in which the Plate Count concentration was decreased and sodium arsenite concentration was increased; After studying the four strains tested was determined that the more resistant to high concentrations of arsenic on the parameters used was strain CAs3 with strain followed by CAs5 and finally CAs1 and strain CAs2, as assessed by the minimum inhibitory concentration.

The morphology and biochemical tests were used for the identification of these organisms which recognized as: Consortium CAs1 strains are *Bacillus subtilis*, *Bacillus lentus*, *Bacillus cereus*, strain CAs2 was identified as *Pleisomona Spp*, the strain CAs3 was identified as *Bacillus megaterium* and the strain CAs5 was identified as *Pseudomonas spp*. The kinetics of growth of the strains was analyzed, the strain CAs2 and the consortium CAs1 require more time to start their exponential phase while strains CAs3 and CAs5 rapidly enter the exponential phase, and also these strains presented major adaptability to sodium arsenite, showing their affinity for arsenic.

A physicochemically characterization was made in Groundwater of Punta de Bombon, obtained from well of SEDAPAR belonging to the province of Islay department of Arequipa, likewise was evaluated the quality of the water after 24 hour of treatment.

Our study was performed by the evaluation of an alternative for the treatment of arsenic, a biodepurator MBBR system was designed using HDPE mounting in which were added the consortium of microorganisms resistant to arsenic (CAs1, CAs2, CAs3, CAs5) and the water from Punta de Bombon was

treated achieving a biodepuration percentage of 16,08% of arsenic in 24 hours, 10 hours and 10,40% 5 hours, 8,32%. Significant differences was found between the water without treatment and the water treated after 24 hours, but a result under the LMP of arsenic for drinking water wasn't obtained.

Finally it is concluded that the strains *Bacillus subtilis*, *Bacillus lentus*, *Bacillus cereus*, *Pleisomona spp*, and *Pseudomonas spp*, from the geyser Coalaque were highly adaptable to arsenic concentrations and presented partial biodepuration activity using the MBBR system under the conditions laid down in this work, however this system requires longer treatment, so it is not suitable for potabilization treatments; may be an alternative for treatment of arsenic in effluents, waste water or others.

Keywords: *Arsenic, Groundwater, partial biodepuration.*



CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

En la actualidad es tema de preocupación la contaminación de aguas que son destinadas al consumo humano, sobre todo en países en vías de desarrollo, pese a las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud; los sistemas de depuración de contaminantes químicos orgánicos e inorgánicos, no se encuentran en muchos sistemas de distribución de aguas, limitándose a la limpieza de canales y sistemas para eliminar la contaminación microbiana. Dentro de los contaminantes químicos es de creciente preocupación, los de naturaleza inorgánica y dentro de estos los metales pesados (Ej. cadmio) y metaloides (Ej. arsénico). Debido a su movilidad en los ecosistemas acuáticos y su toxicidad, los metales se consideran como uno de los contaminantes que más afectan al medio ambiente, y su impacto en la salud de la población; pues aun cuando se encuentran presentes en cantidades bajas e incluso pudiendo llegar a concentraciones importantes, su naturaleza los hace casi indetectables para el consumidor común. Ciertamente la contaminación puede ser natural o antropogénica, sea cual fuese el origen, el objetivo primario siempre será adoptar medidas para depurar al agua de estos contaminantes.

Nuestro país no es ajeno a esta problemática y a estos intentos de resolver el problema, así observamos que en muchas comunidades, se utilizan aguas potencialmente contaminadas, una de estas aguas son las aguas subterráneas, cuyo destino es el riego de sembríos, además del consumo humano. Es conocido la presencia de arsénico en este tipo de aguas. Este metaloide de carácter insípido e inodoro, que se absorbe por vía respiratoria y gastrointestinal puede generar graves problemas de salud en la población (cáncer de pulmón, leucemias entre otras enfermedades), la dimensión de este problema es tal que la mala calidad del agua constituye la segunda causa de muerte a nivel mundial.

Una de las poblaciones que utilizan aguas subterráneas es precisamente el distrito de Punta de Bombón, perteneciente a la provincia de Islay del departamento de Arequipa, al observar el uso de aguas de pozo de parte de los pobladores de la Punta de Bombón, es que las autoras de la presente investigación

nos vimos motivadas para indagar sobre la existencia de bacterias resistentes a arsénico, que tienen como hábitat nichos acuáticos con alta concentración de arsénico, y que podrían tener el potencial para depurar arsénico de las aguas subterráneas, para ello se realizaron una serie de procedimientos, en primer lugar, aislar las especies bacterianas, probar su resistencia a arsénico -en forma de arsenito de sodio - en placa, identificarlas bioquímicamente; y evaluar la reducción de arsénico en el sistema MBBR; aspectos que se revisaran en el presente documento de tesis.



1.1. HIPÓTESIS

Dado que las aguas subterráneas del distrito de la Punta de Bombón se encuentran contaminadas con arsénico, es probable que el diseño y construcción de un birreactor de lecho móvil (MBBR) que use bacterias extremófilas logre reducir la concentración de este metal en dichas aguas.



1.2. OBJETIVOS:

1.2.1. General

Biodepurar en forma parcial arsénico en aguas contaminadas, usando un biorreactor de lecho móvil (MBBR) con carga bacteriana extremófila - Punta de Bombón, Arequipa.

1.2.2. Específicos:

- Aislar e identificar bacterias que habitan en el geiser ubicado en el distrito de Coalaque, Departamento de Moquegua.
- Determinar la resistencia *in vitro* de las bacterias provenientes de aguas del geiser ubicado en el distrito de Coalaque, departamento de Moquegua a diferentes concentraciones de arsénico.
- Diseñar y evaluar un sistema MBBR capaz de reducir la concentración de arsénico en aguas subterráneas del distrito de Punta de Bombón, departamento de Arequipa utilizando bacterias resistentes provenientes de aguas del geiser ubicado en el distrito de Coalaque, departamento de Moquegua.

1.3. VARIABLES DE ESTUDIO:

Las variables de estudio de esta investigación se presentan en las Tabla N°1 y Tabla N°2.

Tabla 1: Variables independientes

Variables	Abreviatura	Indicadores
Concentración de medio PC ¹ para evaluar la adaptación a arsénico As(III)	CM	M1(1.0250),M2(0.5125),M3(0.3417), M4(0.2563),M5(0.2563),M6(0.2563), M7(0.2563), M8(0.1281)*
Concentración de arsenito de sodio(ppm) para evaluar la adaptación a Arsénico As(III)	CA	M1(400),M2(800),M3(1200) ,M4(1600),M5(1800),M6(2000), M7(2200), M8(6000)**
Tiempo	T	Días

¹ Medio Plate Count, *Concentración en % p-v (g/ml), **Concentración en ppm

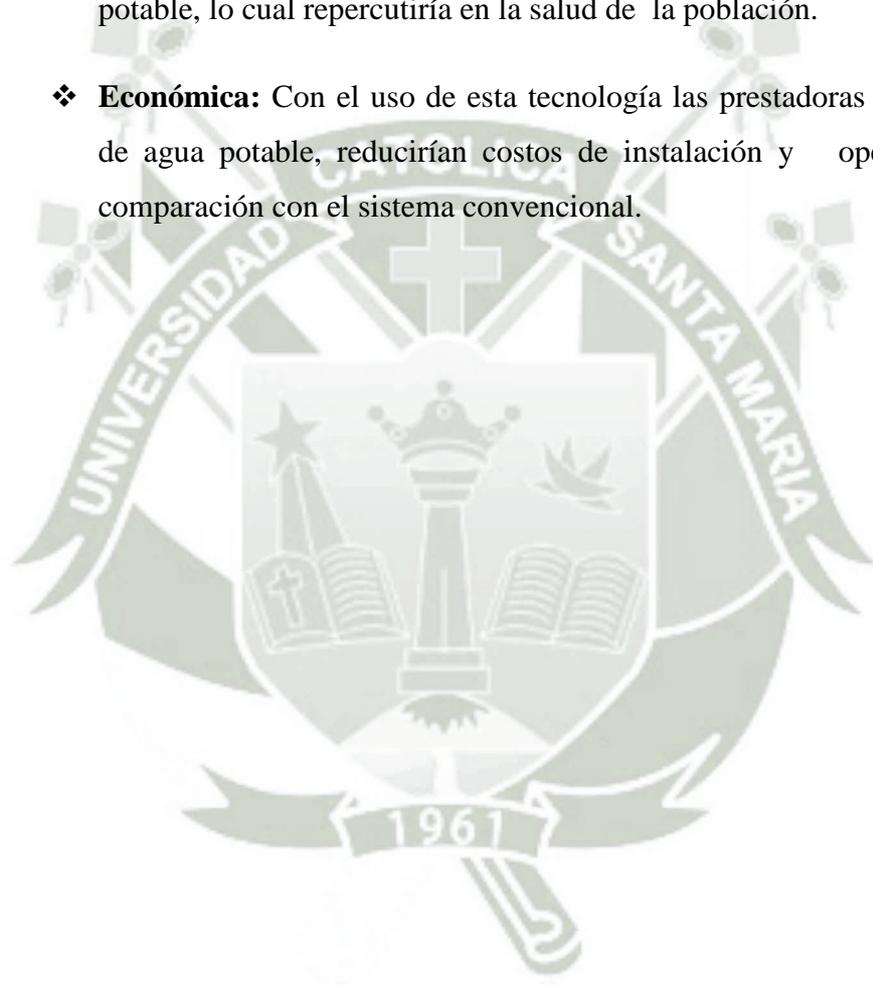
Tabla 2: Variables dependientes

<i>Variables</i>	<i>Abreviaturas*</i>	<i>Indicadores</i>
Adaptación al Arsenito de sodio As(III)	AA	Alta adaptación Mediana adaptación Baja adaptación No presentó adaptación
Identificación bacteriana	IB	Crecimiento en medio de cultivo, tinciones pruebas bioquímicas
Capacidad parcial de biodepuración de arsénico de agua por el sistema MBBR	BA	Concentración de As a las 0,5,10,24 horas de tratamiento.
Calidad del agua subterránea de Punta de Bombón	CA	pH, CND, STD, % sal, turbidez, oxígeno disuelto, cloruros, sulfatos, dureza total antes y después del tratamiento

*AA: Adaptación a arsenito de sodio (III), IB: Identificación bacteriana, BA: Capacidad parcial de biodepuración de arsénico de agua por el sistema MBBR, CA: Calidad del agua subterránea de Punta de Bombón.

1.4. JUSTIFICACIÓN:

- ❖ **Ambiental:** El uso de un sistema biológico que logre la reducción de arsénico en agua puede presentar una solución sin impacto ambiental alguno.
- ❖ **Social:** De acuerdo a los resultados obtenidos se podría lograr en un futuro la implementación de la tecnología probada en el presente trabajo, para reducir la contaminación natural de fuentes de agua potable, lo cual repercutiría en la salud de la población.
- ❖ **Económica:** Con el uso de esta tecnología las prestadoras de servicio de agua potable, reducirían costos de instalación y operación, en comparación con el sistema convencional.



CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. CONTAMINACIÓN DEL AGUA

A lo largo de la historia, la calidad del agua potable ha sido un factor determinante del bienestar humano. Incluso actualmente, el agua insalubre contaminada por fuentes naturales o humanas sigue, causando grandes problemas a las personas que se ven obligadas a usarla, tanto para beber como para la irrigación de hortalizas y otras plantas comestibles crudas.

Aunque hay todavía epidemias ocasionales de enfermedades bacterianas y virales causadas por agentes infecciosos transportados en el agua potable, la mayor preocupación sobre la seguridad del agua es ahora la presencia potencial de contaminantes químicos. Estos pueden incluir productos químicos orgánicos e inorgánicos y metales pesados, procedentes de fuentes industriales, agrícolas y de la escorrentía urbana. ⁽¹⁾

2.2. CONTAMINANTES ELEMENTALES

Elemento traza o vestigial es un término que se refiere a aquellos elementos que existen a niveles muy bajos, de unas partes por millón o menos, en un sistema dado.

Algunos elementos traza encontrados en las aguas naturales están reconocidos como nutrientes requeridos para la vida de plantas y animales, incluyendo algunos que son esenciales a niveles bajos pero tóxicos a niveles más altos. Éste es el comportamiento típico para muchas sustancias en el ambiente acuático, que es un punto que debe tenerse presente al juzgar si un elemento particular es beneficioso o perjudicial. ⁽¹⁾

2.3. ARSÉNICO

El arsénico es clasificado químicamente como *metaloide*, elemento frontera entre metales y no metales, sin embargo, se le refiere frecuentemente como un metal. ^(1,2)

El arsénico(As), presenta número atómico 33 y peso atómico 74,922. El arsénico elemental (llamado también arsénico metálico) es un material sólido de color gris acero. Sin embargo, en el ambiente el arsénico generalmente se encuentra combinado con otros elementos como por ejemplo oxígeno, cloro y azufre. El arsénico combinado con estos elementos se conoce como arsénico inorgánico. El arsénico combinado con carbono e hidrógeno se conoce como arsénico orgánico.

La mayoría de los compuestos inorgánicos y orgánicos de arsénico son polvos de color blanco que no se evaporan. No tienen olor y la mayoría no tiene ningún sabor especial. Por esta razón, generalmente no se puede saber si están presentes en los alimentos, el agua o el aire. ⁽²⁾

Algunos minerales de As se conocen desde tiempos remotos, 300 años antes de Cristo, aunque el As elemental no fue aislado hasta el siglo XIII por Alberto Magno. ⁽³⁾

La presencia de elevados niveles de As en agua está directamente relacionada con su liberación desde la fase sólida, con fenómenos de transporte y de transferencia a otros medios y a procesos de dilución por mezcla. ⁽⁴⁾

El arsénico se halla en las aguas naturales como especie disuelta, la cual se presenta por lo común como oxianiones con arsénico en dos estados de oxidación, arsénico trivalente [As (III)] y arsénico pentavalente [As (V)], y con menos frecuencia como As (0), As (-I) y As (-II). Aunque tanto As (V) como As (III) son móviles en el medio, es precisamente el As (III) el estado más lábil y biotóxico.

El estado de oxidación del arsénico, y por tanto su movilidad, están controlados fundamentalmente por las condiciones redox (potencial redox, Eh) y el pH. De hecho, el arsénico es un elemento singular entre los metaloides pesados y elementos formadores de oxianiones por su sensibilidad a moverse en los valores de pH típicos de las aguas subterráneas (pH 6,5-8,5). ⁽⁵⁾

En general, la forma pentavalente del arsénico As (V) tiende a predominar frente a la forma trivalente As (III) en las aguas superficiales, más oxigenadas que las aguas subterráneas. Sin embargo, en estas últimas no siempre

predomina la forma trivalente, pudiéndose encontrar ambos estados de oxidación. Las concentraciones y proporciones relativas de As(III) y As(V) dependen de la entrada de arsénico en el sistema, las condiciones redox y la actividad biológica.⁽⁴⁾

Las formas orgánicas de arsénico suelen aparecer en concentraciones menores que las especies inorgánicas, aunque pueden incrementar su proporción como resultado de reacciones de metilación catalizadas por actividad microbiana.⁽⁶⁾

2.3.1. El Arsénico en el medio ambiente

El arsénico está ampliamente distribuido en la atmósfera, en la hidrosfera y en la biosfera, ocupando 52^o lugar en abundancia.⁽³⁾

Si bien una gran cantidad de As en el medio ambiente proviene de fuentes naturales (meteorización, actividad biológica, emisiones volcánicas), existe una importante contribución a partir de actividades antropogénicas, tales como procesos industriales (minería, fundición de metales, pesticidas, conservantes de la madera, etc.).⁽⁷⁾

Los niveles de As en el ambiente son variables, ya que es un elemento con muy alta movilidad y capacidad de transformación.^(4,8)

El fenómeno de la existencia de contenidos altos de arsénico de origen natural en las aguas está controlado por tres factores: la fuente primaria de arsénico (geósfera y atmósfera), los procesos de movilización/retención de arsénico en la interacción entre la fase sólida y la fase líquida, y el transporte de arsénico como especie acuosa en el seno del agua.⁽⁹⁾

2.3.2. Toxicidad y efectos a la salud

El grado de toxicidad de los compuestos de As está directamente relacionado con su movilidad en el agua y fluidos corporales, la cual depende de su especiación. Los compuestos inorgánicos son más tóxicos que los orgánicos. Además la especie trivalente, As (III), presenta mayor toxicidad que la especie pentavalente, As (V). En orden decreciente de toxicidad, la secuencia quedaría del siguiente modo: Arsina > As (III) inorgánico > As(III) orgánico > As (V) inorgánico > As(V) orgánico > As elemental.⁽³⁾

Dentro de los mecanismos de toxicidad se ha explicado:

- ❖ El arsénico actúa sobre sistemas de enzimas, el ion arseniato tiene alta afinidad por los grupos sulfidrilo de las proteínas celulares,
- ❖ El arseniato desacopla la fosforilación oxidativa mitocondrial sustituyendo competitivamente el ion fosfato por arseniato
- ❖ El arsénico tiene acción directa sobre las arteriolas y capilares produciendo vasodilatación parálitica, indicador de intoxicación
- ❖ Impide la división celular, observándose anomalías en el núcleo

Después de la absorción por cualquier superficie el 95 -99% del arsénico se localiza en los glóbulos rojos en combinación con la globina y hemoglobina. Sale rápidamente de la sangre en 24 horas y se distribuye hacia el hígado, riñón, pulmones, paredes del tracto gastrointestinal y bazo se encuentran en pequeñas cantidades a nivel muscular y nervioso. ⁽¹⁰⁾

El As inorgánico se absorbe rápidamente por el tracto gastrointestinal y es transportado hacia el hígado donde por metilación podrían producirse monometilarsénico (MMA) y metilarsénico (DMA). Sin embargo, una fracción de As inorgánico podría acumularse en el pelo, las uñas y la piel.

Las especies orgánicas e inorgánicas de As se eliminan por la excreción de orina. La vida media del arsénico inorgánico es de 10 horas el 80 % es excretado en tres días ⁽¹⁰⁾. No obstante, la ingesta de grandes cantidades de As (III) puede ocasionar un envenenamiento rápido y la muerte. ⁽⁵⁾

En la Tabla 3. se muestran lugares y cantidades de personas en riesgo de contaminación por arsénico.

Tabla 3: Población en riesgo de Contaminación por arsénico en agua

País o Área	Población en riesgo	Límite permitido en agua ($\mu\text{gAs/l}$)
Argentina	2.500.000	0,05
Bangladesh	50.000.000	0,05
Bolivia	20.000	0,05
Chile	437.000	0,05
China, Mongolia interior	600.000	0,05
China, Xinjiang	100.000	0,05
Hungría	220.000	0,01
India, bengala occidental	1.000.000	0,05
México	400.000	0,05
Perú	250.000	0,05
Rumania	360.000	0,01
Taiwán	200.000	0,01

Fuente: Roberto Edgar Cáceres, Tesis Doctoral, 2007

La ingesta de arsénico en el agua de bebida durante largos períodos de tiempo se ha asociado con una enfermedad denominada hidroarsenicismo crónico regional endémico (HACRE), que se caracteriza por lesiones en la piel ⁽¹⁾

En el caso de Bangladesh, se ha observado la enfermedad conocida como “Pies negros”, cuando la ingesta diaria de As inorgánico está entre 10 y 50 $\mu\text{g/kg}$ de peso corporal. Esta enfermedad se manifiesta con problemas vasculares, que derivan en algunos casos en necrosis y gangrena en las manos y los pies, de ahí su nombre. ⁽³⁾

Basados en datos epidemiológicos, los compuestos arsenicales inorgánicos han sido clasificados como carcinógenos. Las manifestaciones clínicas de arsenicismo crónico en humanos incluyen efectos no cancerosos (hipo e hiperpigmentación, queratosis, hipertensión, enfermedades cardiovasculares y diabetes) y cánceres de piel, pulmón y vejiga. También han sido relacionados con los compuestos inorgánicos de arsénico una variedad de cánceres que afectan otros órganos. Los compuestos arsenicales inorgánicos han sido considerados como

tóxicos de primer orden en la lista de contaminantes prioritarios de la USEPA (US Environmental Protection Agency).⁽¹²⁾

2.3.3. Usos

Comúnmente la palabra arsénico se asocia directamente con veneno. No obstante, el As y sus compuestos tienen variedad de aplicaciones.

- ❖ Preservante de la madera (arseniato de cobre y cromo), uso que representa, según algunas estimaciones, cerca del 70% del consumo mundial de arsénico.
- ❖ Semiconductor (arseniuro de galio) para circuitos integrados y también en la construcción de diodos láser y LED.
- ❖ Aleaciones con Pb para endurecerlo en la fabricación de perdigones.
- ❖ Insecticidas (arseniato de plomo) y herbicidas (arsenito de sodio).
- ❖ Pigmento de pinturas y fuegos artificiales (disulfuro de arsénico).
- ❖ Decolorante en la fabricación de vidrio (trióxido de arsénico) para eliminar de color verde que producen las impurezas de Fe.
- ❖ Con fines terapéuticos, sobre todo antiguamente. En la actualidad han sido reemplazados por antibióticos.⁽³⁾

2.4. LEGISLACIÓN AMBIENTAL

La legislación peruana a través del D.S 02-2008-MINAM, establece los estándares de calidad de agua, considera 0,01 mg/L (ppm), para aguas que pueden ser potabilizadas con desinfección o con tratamiento convencional, y 0,05 mg/L para aguas que pueden ser potabilizadas con un tratamiento avanzado.⁽¹³⁾

Asimismo la Dirección general de salud ambiental (DIGESA) en el DS N° 031-2010-SA. Reglamento de la Calidad del Agua para Consumo Humano⁽¹⁴⁾ establece los límites máximos permisibles para agua de consumo humano, establece como LMP de Arsénico 0,01 mg/L (ppm) En el anexo I se adjunta las tablas con los parámetros de calidad para agua potable.

La agencia de protección ambiental de los estados unidos (EPA) a partir enero del 2006 ha adoptado el nivel de 0,01 mg/l como nivel de contaminación máximo para aguas de consumo humano⁽¹⁵⁾; similar a las leyes

argentinas y a la comunidad económica europea, por su parte, países como Chile, México, India, Taiwán Y China lo estipulan en 0,05 mg/l. ⁽¹⁶⁾

2.5. PROCESOS BIOLÓGICOS PARA EL TRATAMIENTO DE AGUAS CONTAMINADAS CON ARSÉNICO

Se han desarrollado una gran cantidad de tecnologías con el fin de eliminar el As del agua, sólo que estas técnicas resultan ser complejas y caras.

En general, el tratamiento de agua potable está orientado a remover color, turbiedad y microorganismos de origen fecal. Esta remoción se logra a través de una combinación adecuada de procesos: coagulación-floculación-sedimentación-filtración y desinfección. Pero cuando se desea remover elementos químicos del agua, como el As, es necesario recurrir a métodos más complejos. ⁽¹⁷⁾

Existen diversas tecnologías para remover As del agua con eficiencias del 70 al 99%, estas eficiencias pueden variar por factores como el pH, concentración inicial de As, así como por la forma y estado de oxidación en la cual se encuentra el Arsénico (As(V) y/o As(III)).

La actividad bacteriana puede jugar un papel catalizador importante en varios de los procesos de remoción de As, pero se conoce poco sobre la viabilidad del uso de procesos biológicos para eliminar el As en agua. ⁽¹⁸⁾ Estudios a escala piloto muestran que condiciones óptimas de pH, temperatura y oxígeno permiten la filtración biológica y eliminación simultánea de As (III) y hierro.

Los microorganismos tienen la capacidad de adaptarse a multitud de agentes contaminantes, tanto orgánicos como inorgánicos y, si bien es cierto que los microorganismos no pueden destruir los metales pesados, si pueden influir en su movilidad en el medio ambiente, modificando sus características químicas y/o físicas. Es por ello que desde el año 1986 se están empleando procesos biológicos en la descontaminación de efluentes con metales pesados y desde ese año se ha avanzado mucho en tecnologías destinadas a emplear los microorganismos como agentes descontaminantes. ⁽¹⁹⁾ Las investigaciones han crecido extensivamente, la legislación en muchos países ha conllevado a una búsqueda intensa para nuevas tecnologías de tratamientos biológicos. ⁽²⁰⁾

La filtración biológica para el tratamiento de arsénico puede aplicarse a cualquier sistema de agua subterránea para la oxidación bacteriológica del hierro ⁽²¹⁾. También se están desarrollando con éxito métodos de filtración empleando esporas para la remoción de arsénico.⁽²²⁾

Según la U.S. EPA ⁽²³⁾ la fitorremediación implica el uso de plantas para degradar, extraer, contener o inmovilizar los contaminantes en el suelo, sedimentos y aguas subterráneas. En general, es aplicable a suelos poco profundos o aguas subterráneas relativamente poco profundas que puedan ser alcanzadas por las raíces de las plantas.

2.6. RESPUESTAS MICROBIANAS A AMBIENTES CON ARSÉNICO

Debido a la prevalencia de arsénico en el medio ambiente, no solo la mayoría de organismos vivientes han desarrollado mecanismos de resistencia a arsénico sino que alguno de ellos son capaces de utilizar o incluso requerir arsénico para su fisiología, estos pueden usar Arsénico para la respiración, y /o como donador de electrones, aparte de alterar el estrado redox del arsénico, algunos microbios puedes también metilar especies inorgánicas. Tales actividades microbianas en agua y sedimentos influyen fuertemente en la especialización y la biodisponibilidad de arsénico, participando activamente en su ciclo ambiental. ⁽²⁴⁾

Dependiendo del estado de oxidación que se presente un metal y la especie que esté conformando, un microorganismo puede realizar la inmovilización del metal, es decir el pasaje de un estado soluble inicial en fase acuosa a uno insoluble final en fase sólida. ⁽²⁵⁾

2.7. REACTOR DE BIOPELÍCULA DE LECHO MÓVIL (MBBR)

Un biorreactor es un recipiente en el cual se lleva a cabo la reacción catalizada por enzimas o células, libres o inmovilizadas, junto con los mezcladores, equipos de toma de muestra y aparatos de control.⁽²⁶⁾ Un biorreactor es la parte principal de cualquier proceso bioquímico en el que se emplean sistemas microbianos o sistemas celulares. La función principal de un biorreactor diseñado apropiadamente es la de proveer un medio controlado para alcanzar el

crecimiento y la formación de productos óptimos, o cualquiera de ambos, en el sistema celular particular empleado.⁽²⁷⁾

El MBBR se desarrolló en Noruega, en la Universidad de Ciencia y Tecnología en cooperación la empresa Kaldnes Miljøteknologi (ahora AnoxKaldnes AS). La primera MBBR se instaló en 1989. Aunque es una tecnología relativamente nueva en los Estados Unidos (por primera vez en 1995), en la actualidad hay más de 400 instalaciones en todo el mundo, tanto en los sectores industriales y municipales con más de 36 en América del Norte.⁽²⁸⁾

El sistema MBBR se caracteriza por su operación en flujo continuo y porque utiliza todo el volumen del reactor para el crecimiento de la biomasa bacteriana, en el cual la biopelícula se encuentra protegida en el interior de un soporte plástico, diseñados especialmente con una elevada superficie interna⁽²⁹⁾. Estos soportes plásticos se encuentran en suspensión, en continuo movimiento, en un determinado volumen de reactor y completamente distribuidos por toda la fase líquida, sin necesidad de recirculación. El diseño del biosoporte es importante debido a los requerimientos de transferencia del sustrato y de oxígeno a los microorganismos. El principio básico del proceso de lecho móvil es el crecimiento de la biomasa en soportes plásticos que se mueven en el reactor biológico mediante la agitación generada por sistemas de aireación (reactores aerobios).⁽³⁰⁾

Los soportes son de material plástico con densidad próxima a 1 g/cm³ que les permite moverse fácilmente en el reactor incluso con porcentajes de llenado de hasta el 70%. La aireación está diseñada para proporcionar un movimiento hacia arriba, también permite mantener en suspensión el soporte plástico para una adecuada operación del proceso. La Biomasa es la población microbiana, en forma de biopelículas, encargada de depurar el agua contaminada.⁽¹⁹⁾ En la figura 1 se observa el movimiento de los soportes en el reactor MBBR.

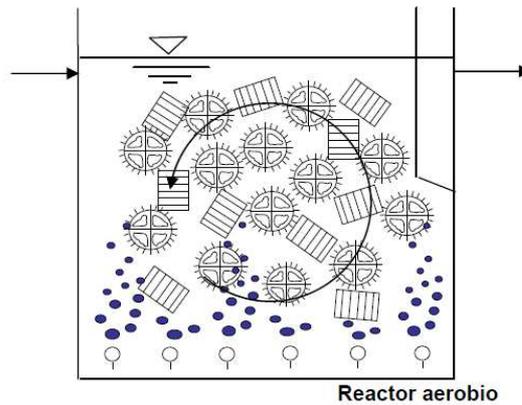


Figura 1: Esquema del biorreactor de lecho móvil ⁽³¹⁾

Las principales ventajas que presenta el sistema MBBR frente a los procesos biológicos convencionales son ⁽³²⁾:

- ❖ Reducción de volumen del reactor biológico por empleo de un soporte que proporciona una superficie específica elevada
- ❖ Alta concentración de biomasa en el soporte lo que permite mayor estabilidad y un menor volumen de reactor.
- ❖ Mínimo nivel de ruido.
- ❖ Fácil transportabilidad de los equipos
- ❖ El biorreactor de lecho móvil no necesita recirculación de la biomasa.
- ❖ Mejores características de sedimentación, estabilidad mejorada y proceso de reducción de la producción de lodos.
- ❖ Bajo consumo de energía

La operación y control sencillo de este tipo de procesos Asimismo entre las desventajas, se pueden citar:

- ❖ Costo elevado del material soporte.
- ❖ Necesidad de plantas productoras de oxígeno o aire comprimido, así como de recipientes para su almacenamiento.

- ❖ Mayor complejidad tecnológica, que repercutirá en los costos de explotación y mantenimiento.

2.8. BIOPELÍCULAS MICROBIANAS.

En la actualidad está bien establecido el hecho de que el estilo de vida bacteriano más común en los ambientes naturales es aquel en que las bacterias se adhieren a una superficie formando una estructura conocida como biopelícula donde encuentran las necesidades fundamentales para su desarrollo. De hecho, podemos considerar que las bacterias que no se encuentren formando parte de una biopelícula constituyen la fase inicial de la formación de otra en una nueva superficie. ⁽¹⁶⁾

La biopelícula o “*biofilm*”, es una estructura compleja formada por agregados celulares (grupos de células densamente empaquetados) y huecos intersticiales, adherida a un material o interfase que puede ser de naturaleza abiótica (rocas, metales, vidrios, plásticos, etc.) o biótica (mucosa intestinal, plantas, etc.). ⁽³³⁾

Los microorganismos de la biopelículas adheridos al soporte, toman principalmente el oxígeno de la atmósfera, para la respiración y se alimentan de materia orgánica contenida en el líquido residual, la cual difunde a través de la biopelícula por diversos mecanismos. ⁽³⁴⁾

2.9. MICROORGANISMOS RESISTENTES A ARSÉNICO

Dentro de la amplia diversidad microbiana, existen microorganismos resistentes y microorganismos tolerantes a metales. Los resistentes se caracterizan por poseer mecanismos de detoxificación codificados genéticamente, inducidos por la presencia del metal. En cambio, los tolerantes son indiferentes a la presencia o ausencia de metal. Tanto los microorganismos resistentes como tolerantes son de particular interés como captadores de metales en sitios contaminados, debido a que ambos pueden extraer los contaminantes. La resistencia o tolerancia experimentada por microorganismos es posible gracias a la acción de diferentes mecanismos.

2.9.1. *Bacillus* SPP.

Los microorganismos del género *Bacillus* son bacilos de gran tamaño (4-10 μm), grampositivos, aerobios estrictos o anaerobios facultativos encapsulados. Una característica importante es que forman esporas extraordinariamente resistentes a condiciones desfavorables. Las especies del género *Bacillus* se clasifican en los subgrupos *B. polymyxa*, *B. subtilis* (que incluye a *B. cereus* y *B. licheniformis*), *B. brevis* y *B. anthracis*.

La presencia de *Bacillus* spp. es frecuente en una gran variedad de ambientes naturales, como el agua y el suelo. Este género de bacterias Gram positivas tienen la ventaja de poseer diversos mecanismos para asegurar su sobrevivencia ante condiciones físicas desfavorables, bajo estas condiciones *Bacillus* spp. inicia una serie de respuestas; si estas respuestas fallan para poder mantenerse en estado vegetativo se induce la esporulación ⁽³⁵⁾. La habilidad de las especies de *Bacillus* de formar endosporas altamente resistentes les da una ventaja competitiva muy importante ⁽³⁶⁾. Así mismo, *Bacillus* spp. También se deben adaptar a cambios bruscos de temperatura, para esto cuentan con genes de shock térmico inducibles que incluyen proteínas chaperonas y proteasas

2.9.2. *Pseudomonas* SPP.

Pseudomonas es un género de bacilos rectos o ligeramente curvados, Gram negativos, oxidasa positivos, aeróbicos estrictos aunque en algunos casos pueden utilizar el nitrato como aceptor de electrones.

Los miembros de este género generalmente son móviles gracias a uno o más flagelos polares que poseen, son catalasa positivos y no forman esporas.

El género demuestra una gran diversidad metabólica, y consecuentemente son capaces de colonizar un amplio rango de nichos. Son de fácil cultivo *in vitro* y ampliamente disponibles en número, por lo que ciertas cepas son excelentes para investigaciones científicas.

Las *Pseudomonas* crecen en medios simples. En caldo crecen abundantemente formando un anillo y un sedimento de color verde azulado. En

agar simple forman colonias brillantes, confluentes, de borde continuo y a veces ondulado con un centro opaco.

La ubicuidad de las bacterias del género *Pseudomonas* y su capacidad para explotar una amplia variedad de nutrientes refleja un sistema de adaptación al medio ambiente que no encuentra parangón en las bacterias de otros géneros.

Las cepas del género *Pseudomonas* son capaces de procesar, integrar y reaccionar a una amplia variedad de condiciones cambiantes en el medio ambiente, y muestran una alta capacidad de reacción a señales físico-químicas y biológicas. Se han descrito cepas capaces de adquirir resistencia a metales pesados, disolventes orgánicos y detergentes, lo cual les permite explotar una amplia gama de fuentes de carbono como nutrientes, así como colonizar ambientes y nichos que difícilmente son colonizables por otros microorganismos. Por ello no es sorprendente que se considere a las bacterias del género *Pseudomonas* un paradigma de versatilidad metabólica, y microorganismos claves en el reciclado de materia orgánica en los compartimentos aeróbicos de los ecosistemas, jugando, por tanto, un papel esencial en la mejora y el mantenimiento de la calidad medioambiental. Además de su uso en biodegradación las especies del género *Pseudomonas* se emplean en distintos procesos industriales, tales como la fabricación de bioplásticos o en técnicas de biocontrol. ⁽³⁷⁾

2.9.3. *Pleisomonas* SPP.

Bacilo Gram (-), móvil por flagelos polares lofotricos. Mide 0,1 a 1 x 2 a 3 μm . Es Anaerobio facultativo, fermentador de glucosa y otros carbohidratos sin producción de gas.

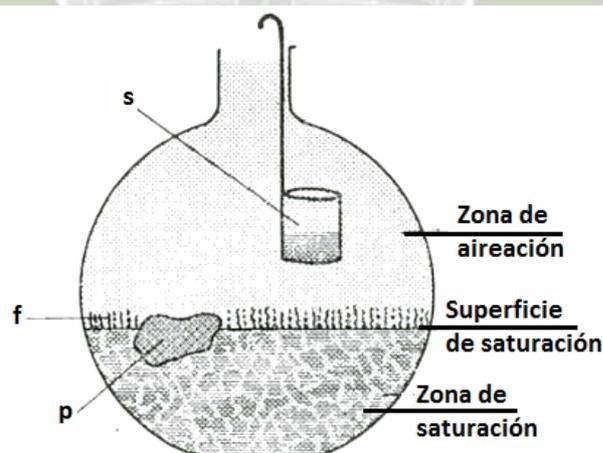
Es un organismo normal del intestino de peces de agua dulce. Raramente se encuentra en heces de personas. Tiene un rango de hospedadores más amplio que *Aeromonas*: peces de río, ostras, mariscos, monos, perros, gatos, cerdos, etc. Asimismo se encuentra en ambientes naturales como agua. ⁽³⁸⁾

2.10. AGUAS SUBTERRÁNEAS

Las aguas existentes en la superficie del suelo están sometidas al peso de la gravedad. Se infiltran, pues, por los poros, las pequeñas fisuras. Así, a partir de una cierta profundidad todos los intersticios entre las rocas acaban por llenarse de agua, el nivel asciende en razón de las infiltraciones, mientras que encima, al contrario, están normalmente vacíos.

De ello resulta que las aguas continentales no se encuentran en capas libres fuera de los ríos y de los lagos; debe existir, pues una profundidad suficiente para que las infiltraciones se acumulen. El agua subterránea es, en definitiva, “la roca” más común y su presencia es prácticamente universal.

La forma de yacimiento de las aguas subterráneas, de la cual no nos damos siempre perfectamente cuenta, ha sido ilustrada con claridad por Oscar Meinzer desde 1923. Meinzer en esta época geólogo del departamento de aguas subterráneas del Servicio Geológico de los Estados Unidos. Para dar una imagen concreta de la forma de yacimiento de las aguas subterráneas, Meinzer había tomado un balón lleno de arena. Entre los granos de arena existen huecos comunicados los unos con los otros, de manera que queda sitio para el agua. Como se aprecia en la figura 2



f: franja capilar; s: agua suspendida; p: guijarro no poroso

Figura 2: Balón de Meinzer⁽³⁹⁾

Si no se llena totalmente el balón, será fácil observar, después de un tiempo suficiente, que el agua desciende hasta saturar todos los poros del fondo del recipiente.

A causa de las comunicaciones entre los poros, la superficie de esta agua será plana, análoga a la de una capa libre. Se distingue así una zona de saturación con su correspondiente superficie de saturación y también una zona de aireación, a través de la cual se hacen los cambios con la atmósfera (alimentación por infiltraciones y pérdidas por evaporación).

Esto se realiza exactamente igual en la naturaleza. En ella encontramos que el suelo bajo nuestros pies presenta unas fisuras por donde se infiltran las aguas de lluvia o de escorrentía, hasta que llegan a la zona de saturación. Cuando se hace un pozo en un terreno poroso, se comienza por atravesar los terrenos secos de la zona de aireación, antes de alcanzar las rocas de la zona de saturación, donde todos los huecos están llenos de agua. A partir de este nivel, el espacio perforado que forma el pozo se rellena también de agua y la cota alcanzada es justamente la de la superficie de saturación. La figura 3 representa un pozo tradicional con la delimitación de las diversas zonas. ⁽³⁹⁾

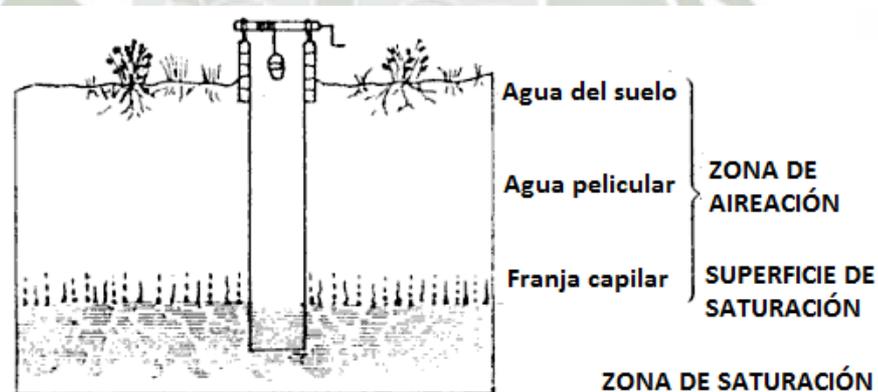


Figura 3: Distribución del agua subterránea

2.11. DISTRITO DE PUNTA DE BOMBÓN Y SU CONTAMINACIÓN POR ARSÉNICO.

El distrito Punta de Bombón es uno de los seis distritos que conforma la provincia de Islay del departamento de Arequipa, reconocida como tal mediante Ley s/n el 3 de enero de 1879 y tiene como capital a la ciudad de La Punta. El distrito de Punta de Bombón se encuentra ubicado al sur de los distritos de Cocachacra y Deán Valdivia, y al norte del departamento de Moquegua, a una altitud de 23 msnm y tiene una extensión territorial de 769,76 km².⁽⁴⁰⁾

El distrito Punta de Bombón está constituido por los centros poblados de La Punta, La Pampilla, Bombón, Catas y población dispersa. Actualmente también está conformado por dos asentamientos humanos, Belaunde y Costanera Sur.

Según el censo INEI 2007⁽⁴¹⁾, la población del distrito de Punta de Bombón con sus 6 621 habitantes representa el 12,67 % de la población a nivel provincial y el 19,80 % de su extensión territorial; asimismo la densidad aproximada de 8,60 Hab/Km². El distrito de Punta de Bombón está conformado con un total de 2 018 viviendas.⁽⁴¹⁾

Según el censo INEI 2007⁽⁴¹⁾, la mayoría de la población (81,50 %) se abastece de agua de una red pública dentro de la vivienda, seguido de un 6,46 % de habitantes que se provee agua de pozo, en tercer lugar un 3,32 % que se abastece de agua a partir de una red pública fuera de la vivienda y de un pilón de uso público, así como de otros tipos de abastecimientos de agua.

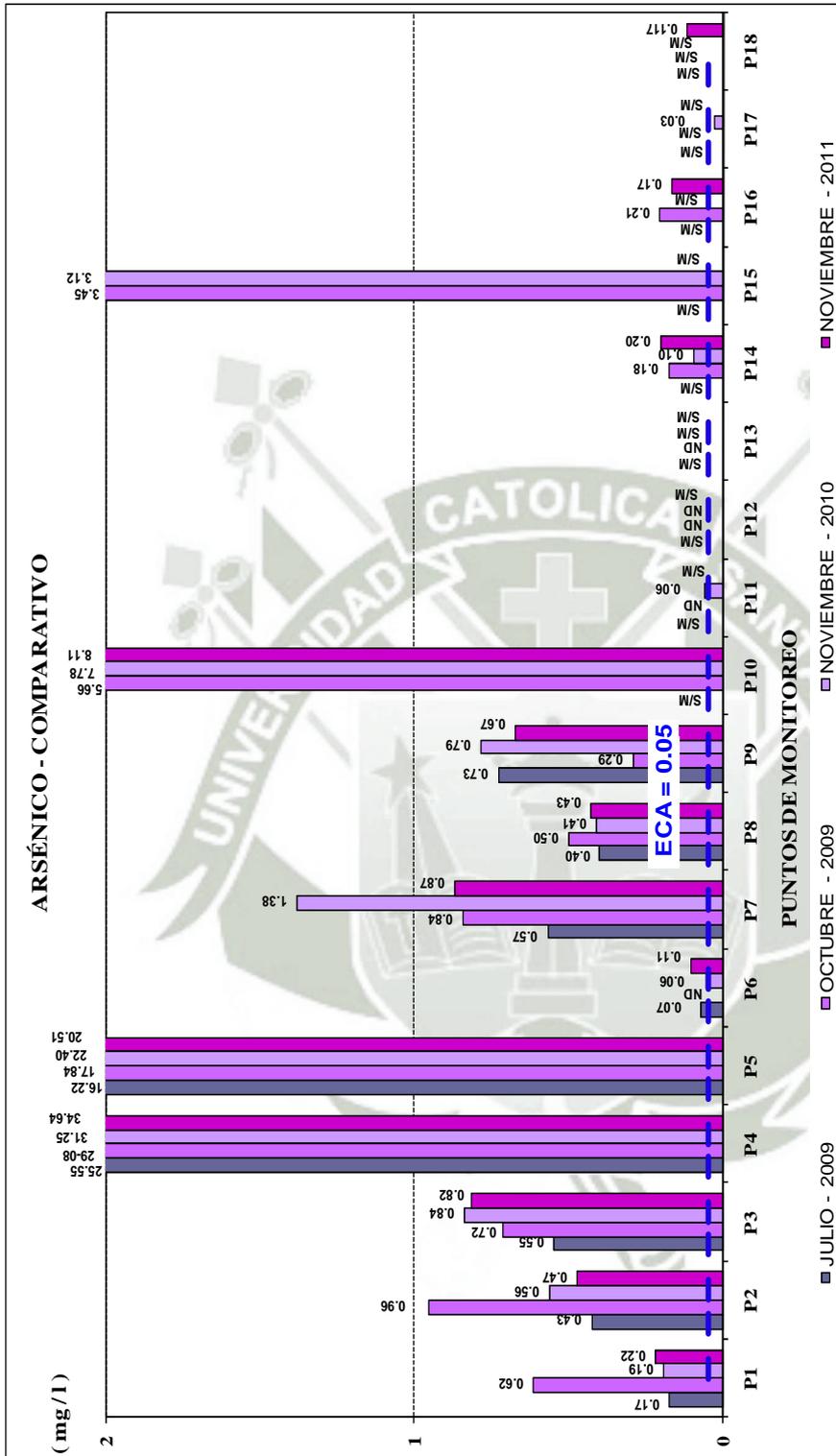
Actualmente según las entrevistas realizadas a autoridades del distrito, manifestaron que el servicio de abastecimiento de agua es deficiente tanto en calidad como en cantidad, a la vez señalan que en época de verano el agua que les llega dentro de sus hogares se encuentra en mal estado por no tener un buen tratamiento, el tratamiento existente es un sistema de cloración básico, el cual desinfecta el agua pero la concentración de sales disueltas en el agua no es tratada; el tratamiento es realizado en el tanque de almacenamiento ubicado en la parte alta del cerro “Bandurrias” desde donde se distribuye el agua. La fuente de

abastecimiento es un pozo de agua subterránea; asimismo el horario de abastecimiento a la población es de 6 a.m. a 1 p.m. El servicio de Abastecimiento es realizado por la EPS SEDAPAR S.A.

Según monitoreos realizados por SEDAPAR y la Dirección regional de Salud ambiental durante el año 2013 la concentración de arsénico encontrada el pozo de abastecimiento de agua tanto como en la red pública presentó un rango de 0,051 a 0,111 ppm de arsénico. La contaminación del agua subterránea de Punta de Bombón es debida a que la cuenca del río Tambo presenta altos niveles de arsénico, y otros metales.

La cuenca del río Tambo, comprende a las provincias de Mariscal Nieto y Sánchez Cerro en Moquegua, Arequipa e Islay en el departamento de Arequipa, y San Román en el departamento de Puno. Geográficamente se encuentra comprendida entre los paralelos 16° 00' y 17° 15' de latitud sur, entre los meridianos 70° 30' y 72° 00' de longitud oeste, forma parte del Sistema Hidrográfico de la Vertiente del Pacífico; cubriendo una extensión de aproximadamente 12 744,41 Km².⁽⁴²⁾

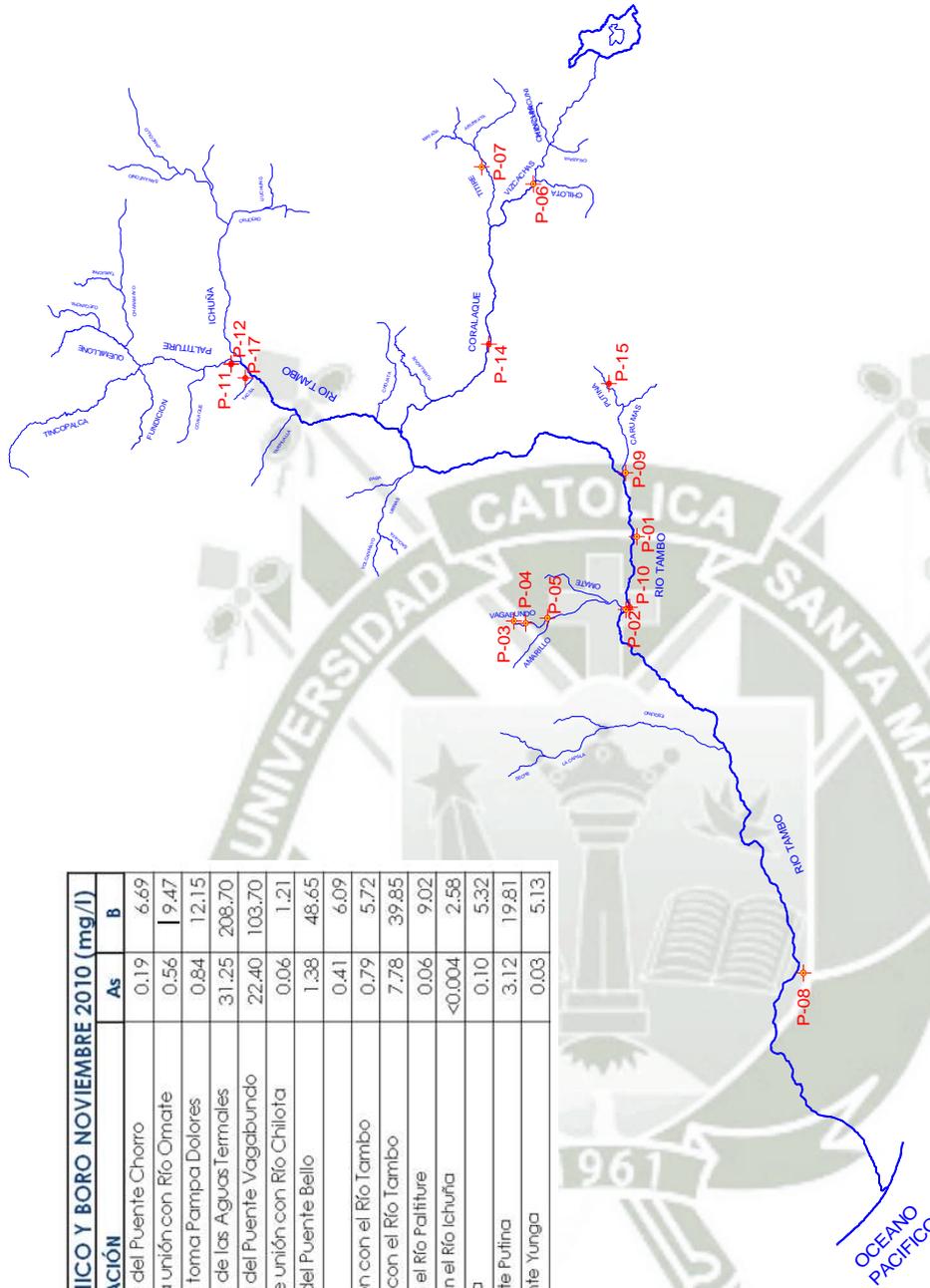
Un estudio de la calidad del río Tambo que fue realizada durante los años 2009, 2010 y 2011.⁽⁴²⁾ Según monitoreos realizados por dicho estudio se determinó que la mayores fuente de contaminación corresponde al río Vagabundo, el cual presentó hasta 34,64 ppm de arsénico, como se observa en la figura 1, esta contaminación es debida a la presencia en la zona de varios geisers, la mayoría de los puntos monitoreados presentaron una concentración de arsénico superior al ECA 0,05 ppm (para agua para riego de vegetales y bebida de animales- ya que este es el principal destino del agua del río Tambo), mientras algunos pocos estuvieron bajo el ECA, como se presenta en la figura 4; se observó que a excepción de las muestras correspondientes al río Vagabundo (P-4 y P-5), los ríos presentan concentraciones que oscilan entre 0,004 y 7,779 ppm, las variaciones de concentración de deben a la dilución de este en los correspondientes caudales y a la combinación de aguas que ocurren durante el transcurso del río Tambo.



Fuente: OIKOS Consultoría Ambiental SAC – Río Tambo, Julio y Octubre 2009 – Noviembre 2010 – Noviembre 2011

Figura 4: Comparación de los niveles de Arsénico entre Julio - Octubre 2009, Noviembre 2010 y Noviembre 2011

CONCENTRACION DE ARSENICO Y BORO NOVIEMBRE 2010 (mg/l)			
PTO	UBICACIÓN	As B	
		P1	Río Tambo, 80 m aguas abajo del Puente Chorro
P2	Río Tambo, aguas abajo de la unión con Río Omate	0.56	9.47
P3	Río Vagabundo, aguas arriba toma Pampa Dolores	0.84	12.15
P4	Río Vagabundo, aguas abajo de las Aguas Termales	31.25	208.70
P5	Río Vagabundo, aguas arriba del Puente Vagabundo	22.40	103.70
P6	Río Vizcachas, aguas abajo de unión con Río Chilota	0.06	1.21
P7	Río Titire, 500 m aguas abajo del Puente Bello	1.38	48.65
P8	Río Tambo: Quelguia	0.41	6.09
P9	Río Carumas, antes de la unión con el Río Tambo	0.79	5.72
P10	Río Omate, antes de la unión con el Río Tambo	7.78	39.85
P11	Río Ichuña, antes de la unión con el Río Palliture	0.06	9.02
P12	Río Palliture, antes de la unión con el Río Ichuña	<0.004	2.58
P14	Río Coralaque, camino a Chajata	0.10	5.32
P15	Río Putina, aguas abajo del Puente Putina	3.12	19.81
P17	Río Tambo, aguas abajo del Puente Yunga	0.03	5.13



Fuente: OIKOS Consultoría Ambiental SAC – Río Tambo, Julio y Octubre 2009 – Noviembre 2010 – Noviembre 2011

Figura 5: Concentración de Arsénico en la cuenca del Río Tambo

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LUGAR DE LA INVESTIGACIÓN

❖ *Muestra de geiser Coalaque (MG)*

Fue tomada en el geiser Coalaque, Provincia General Sánchez Cerro, departamento de Moquegua,

La muestra para la determinación de Arsénico (MG-1) proveniente del geiser Coalaque, fue llevada al laboratorio Analítico del Sur, ubicado en Parque industrial C-1, Cerro Colorado-Arequipa

La muestra microbiológica (MG-2) para el aislamiento, identificación y resistencia fue tratada en los laboratorios de Genética y Biología Molecular, ubicados en el campus de la Universidad Católica de Santa María de Arequipa.

❖ *Muestra de punta de bombón (MP)*

Las muestras de agua subterránea fueron recolectadas del pozo de abastecimiento de agua potable del distrito de la Punta de Bombón, perteneciente a la provincia de Islay del departamento de Arequipa

El análisis fisicoquímico del agua subterránea de Punta de Bombón MP fue realizado en el laboratorio de control de calidad de la Planta La Tomilla de la empresa SEDAPAR.

La determinación del contenido de Arsénico inicial y la determinación de arsénico durante la evaluación del sistema MBBR, fue efectuado por el laboratorio de Control de Calidad de la Universidad Católica de Santa María.

3.2. MATERIALES UTILIZADOS EN LA INVESTIGACIÓN

3.2.1. Material biológico

Muestras de aguas subterráneas del geiser Coalaque

3.2.2. Instrumental de Vidrio

- ❖ Vasos de precipitado: 50, 100, 250 ml
- ❖ Baguetas
- ❖ Probeta graduada de: 50 y 100 ml
- ❖ Termómetros
- ❖ Tubos de ensayo
- ❖ Pipetas graduadas 1, 2,5,10 ml
- ❖ Matraces
- ❖ Beakers
- ❖ Frascos de vidrio de 250 ml
- ❖ Láminas portaobjetos
- ❖ Láminas cubreobjetos

3.2.3. Equipos y Aparatos

- ❖ Espectrofotómetro Spectrum Sp 1105
- ❖ espectrofotómetro UV 1601 PC
- ❖ Espectroscopio de Emisión Óptica -ICP , Optima 8000 Marca PerkinElmer
- ❖ Cámara Neubauer
- ❖ Desecador: MemmertSchutzart DIN 40050-IP20
- ❖ Balanza analítica: Maroa y M Scout Pro DHAUS
- ❖ Lámpara de luz ultravioleta: Camal- kossodo SAI-CA004 KS/WI
- ❖ Turbidímetro de escala expandida maraca Hatch modelo 2100N.
- ❖ Conductímetro modelo Melter Toledo.
- ❖ Potenciómetro modelo mv/OPRMelter Toledo.
- ❖ Autoclave Fravill
- ❖ Estufa de secado y esterilización J-P Selecta
- ❖ Incubadora J.P Selecta
- ❖ Refrigeradora BOSH

- ❖ Multiparámetro HANNA
- ❖ Balanza Analítica Ohaus Adventure
- ❖ Balanza Ohaus Scout-pro
- ❖ Microscopio binocular CARL ZEISS PRIMOSTAR
- ❖ Micropipetas 20 uL, 200 uL, 1000 uL LEPPENDORF

3.2.4. Reactivos

- ❖ Buffer de dureza
- ❖ Cianuro de calcio
- ❖ Negro de ericromo T
- ❖ EDTA 0,01 M
- ❖ Agua desionizada
- ❖ Cromato de potasio al 10 %
- ❖ Nitrato de plata 0,0141 N
- ❖ Solución amortiguadora de sulfatos
- ❖ Cloruro de bario
- ❖ Ácido clorhídrico 1 N
- ❖ Solución Stock Buffer Fosfato
- ❖ Solución de Cloruro de Magnesio
- ❖ Aceite de Inmersión PANREAC
- ❖ Agar Manitol Salado DIFCO
- ❖ Agar SIM DIFCO
- ❖ Agar TSI DIFCO
- ❖ Agar-agar DIFCO
- ❖ Base para Agar Sangre DIFCO
- ❖ Caldo Nitrato DIFCO
- ❖ Caldo Tioglicolato DIFCO
- ❖ Agar soya tripticasa DIFCO
- ❖ Clotrimazol
- ❖ Medio Urea Cristensen DIFCO
- ❖ Medio Hugh Leifson DIFCO
- ❖ Parafina(aceite)
- ❖ Agar Mc Conkey DIFCO

- ❖ Medio Leche Litmus
- ❖ Solución fisiológica salina estéril
- ❖ Medio gelatina nutritiva HIMEDIA LAB
- ❖ Reactivo de Kovacs LABSAR
- ❖ Agua destilada
- ❖ Arsenito de Sodio
- ❖ Agar Plate Count
- ❖ Urea Christensen
- ❖ Kit para tinción gram
- ❖ Kit para tinción Wirtz-Conklin
- ❖ Peróxido de hidrogeno

3.2.5. Otros

- ❖ Aceite de inmersión
- ❖ Espátulas
- ❖ Guantes quirúrgicos
- ❖ Frascos de plástico con tapa hermética.
- ❖ Placas Petri descartables de 10cm y 5 cm
- ❖ Cooler.
- ❖ Lápiz marcador
- ❖ Algodón estéril
- ❖ Asa de siembra
- ❖ Barbijo
- ❖ Gasa
- ❖ Gradilla
- ❖ Papel aluminio
- ❖ Papel craft
- ❖ Lima circular
- ❖ Frasco de vidrio (semillero)
- ❖ Tapa ternopor
- ❖ Tapón de goma con 2 orificios
- ❖ Mangueras de plástico 0,5 cm de diámetro
- ❖ Soportes de polietileno alta densidad (PEAD)

- ❖ Tanque de alimentación de plástico
- ❖ Aire comprimido
- ❖ Cilindro de acrílico altura 24,5 y diámetro 18,1 cm
- ❖ Difusor de aire
- ❖ Filtro de aire 2 μ m
- ❖ Bomba de alimentación
- ❖ Parafilm
- ❖ Tubos eppendorf 1,5 mL

3.3. MÉTODOS

3.3.1. Obtención de muestras del geiser coalaque (MG)

Se llevó a cabo en el departamento de Moquegua, Provincia General Sánchez Cerro, Distrito de Coalaque, esta muestra fue tomada de un geiser ubicado geográficamente a una Latitud de $16^{\circ}36'15.21''S$ y Longitud $71^{\circ}2'15.44''O$, y a una distancia aproximada de 7 kilómetros del pueblo de Coalaque.

- Para el análisis de arsénico (MG-1), se utilizó un frasco de plástico polipropileno esterilizado con capacidad de 1000 ml. los cuales fueron previamente lavados y dejados en ácido nítrico para eliminar trazas de sustancias y enjuagados tres veces con agua destilada.
- Para el aislamiento e identificación de microorganismo resistente a altas concentraciones de Arsénico (MG-2), se utilizó un frasco de vidrio de 1000 ml en el cual se dejó un espacio libre para aireación y mezcla de 1/3 del frasco, el cual fue esterilizado 1 hora a $175^{\circ}C$.

El transporte y almacenamiento se realizó de acuerdo a la NTP-ISO-5667-3:2001 Guía para la preservación y manejo de muestras. ⁽⁴³⁾

❖ *Transporte*

Las muestras estuvieron protegidas y selladas herméticamente de tal forma que no se deterioren y que no se pierda nada de su contenido durante el

transporte. El embalado protegió al recipiente de una posible contaminación externa y rotura particularmente cerca de la tapa, las muestras se mantuvieron frescas y protegidas de la luz, se debe reportar el tiempo entre la toma de muestra y el análisis, no se añadió conservantes, ya que las muestras fueron analizadas antes de las 24 horas de haber sido recolectadas. Las muestras fueron transportadas usando un cooler.

❖ *Almacenamiento*

Las muestras se mantuvieron en la oscuridad a una temperatura menor que en el momento del muestreo:

- La muestra para el análisis de arsénico (MG-1) se usó un refrigerador de -20°C permitiendo un periodo de almacenamiento largo.
- La muestra para el aislamiento e identificación de microorganismo resistente a altas concentraciones de Arsénico (MG-2) no fue congelada.

3.3.2. Caracterización de la muestra del geiser coalaque (MG-1) en Arsénico

La muestra fue analizada por espectrometría de absorción atómica acoplado a la Generación de Hidruros, el análisis fue realizado por los Laboratorios Analíticos del Sur (LAS). Según el método ASTM 2972-03.⁽⁴⁴⁾

3.3.3. Aislamiento de microorganismos de la muestra del geiser coalaque (MG-2)

❖ *Siembra por el método de dilución*

Para el cultivo de las cepas nativas se utilizó la técnica de la siembra por dilución, para ello primero se procedió a esterilizar el material se preparó las diluciones el medio de cultivo y se realizó la siembra como se detalla a continuación.⁽⁴⁵⁾

- **Preparación de diluciones**

Se tomó 10 ml de la muestra con una pipeta, se traspasó a un a fiola de 100 ml, se enrazó la fiola con agua de dilución y se homogenizo; se repitió la operación anterior hasta obtener 6 diluciones. Las diluciones obtenidas se muestran en la Tabla N° 4

Para la preparación del agua de dilución, se mezcló 1.25 ml. de solución Stock de Buffer Fosfato (SOLUCION A) y 5 ml. de Solución de Cloruro de Magnesio (SOLUCIÓN B), posteriormente se enrasó a 1 L y se mantuvo en refrigeración.

Tabla 4: Diluciones Obtenidas para la siembra por dilución

Diluciones % (V/V)	Código
Sin dilución	D-0
10	D-1
1	D-2
0,1	D-3
0,01	D-4
0,001	D-5
0,0001	D-6

Para preparar solución Stock de Buffer Fosfato: se disolvió 34,0 g. de fosfato de Potasio Dihidrogenado (KH_2PO_4), en 500 ml. de agua grado-reactivo, se ajustó el pH a $7,2 \pm 0,5$ con solución de Hidróxido de Sodio (NaOH) 1N, y se diluyó a 1 litro con agua grado reactivo. Para la preparación de la solución de Cloruro de Magnesio se disolvió 81,1g. $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en 1 litro de agua grado-reactivo.

- **Preparación de medio de cultivo**

Se utilizó como medio Agar Soya Trypticasa, para lo cual se disolvió 40 g de medio por litro de agua purificada se agregó 50 ppm de arsenito de sodio se calentó con agitación suave hasta su completa disolución durante un minuto se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

- *Siembra*

Se dejó enfriar a una temperatura entre 45-50 °C y se vertió a las placas Petri estériles aproximadamente 20 ml del medio preparado, se agregó 0.1 ml de las diluciones D-0, D-2, D-4, D-6, se agitó suavemente para homogenizar, se dejó gelificar y se preparó un blanco como referencia, se incubó a 37°C por 3 días. Se realizó las pruebas por triplicado.

❖ *Resiembra.*

Se observó la morfología de las colonias y se traspasó de las placas con mayor dilución al medio Plate Count, para lo cual se disolvió 20,5 g de medio por litro de agua purificada se agregó 50 ppm de arsenito de sodio se y 250 µg/ml del antimicótico clotrimazol, se calentó con agitación suave hasta su completa disolución durante un minuto se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Se realizó la resiembra por el método de estría y se incubó a 37°C por 3 días. ⁽⁴⁵⁾

❖ *Obtención de cultivos puros y consorcios*

Las colonias mixtas fueron sembradas por agotamiento en medio Plate Count y 100 ppm de arsenito de sodio, y se vió al microscopio usando tinción Gram, se repitió este procedimiento 3 veces procurando tener cultivos puros, las colonias que no se lograron aislar fueron tomadas como consorcios.

3.3.4. Adaptación de las muestras del geiser coalaque (MG-2) a Arsénico (III) en medio sólido.

Se evaluó la adaptación a Arsenito de Sodio (As III) por las bacterias aisladas, se utilizó 8 medios, cada uno de los cuales presentó diferentes concentraciones de medio Plate Count y de arsenito de sodio, como se observa en la tabla 5; se sembró por triplicado las bacterias (puras y consorcio) y se procedió a evaluar su crecimiento a los 3, 7, 14,21 días de haber sido sembradas e incubadas a 37 °C. ⁽⁴⁵⁾

Tabla 5: Medios Evaluados en la adaptación

Medio	Concentración de Medio Plate Count % p-v ¹	Concentración de arsenito de sodio(mg/l)
M1	1,0250	400
M2	0,5125	800
M3	0,3417	1200
M4	0,2563	1600
M5	0,2563	1800
M6	0,2563	2000
M7	0,2563	2200
M8	0,1281	6000

1.- El porcentaje P-V de la concentración del medio se encuentra es g/ml

La evaluación de la adaptación o resistencia de los microorganismos al As (III) fue cualitativa, para lo cual se usó la variable categórica presentada en la tabla 6, donde +++ significa que se obtuvo crecimiento en las tres placas sembradas correspondientes a la prueba por triplicado, ++- significa crecimiento en dos las placas, +- en solo una y --- en ninguna.

Asimismo se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM), determinada como la concentración de arsénico y de medio al cual no se presentaba adaptación (---) a los tres días de sembrados los microorganismos.

Tabla 6: Categorías para la evaluación cualitativa de la adaptación a arsenito de sodio (As III)

Símbolo	Categoría
+++	Alta adaptación
++-	Mediana adaptación
+-	Baja adaptación
---	No presenta adaptación

3.3.5. Identificación de las cepas adaptadas a AS (III)

Luego de obtener las máximas resistencias de las cepas ensayadas se procedió a aislar el consorcio CAs1 sembrando en medio agar sangre + 200 ppm de arsenito de sodio por el método de agotamiento.

Las especies aisladas fueron caracterizadas morfológicamente al microscopio mediante tinción Gram, tinción de Wirtz-Conklin; posteriormente se sembró en agar Mc Conkey y por último se realizó la caracterización bioquímica a través de las siguientes pruebas: catalasa, oxidasa, TSI, medio OF, medio gelatina, motilidad, prueba de indol, caldo tioglicolato, prueba leche litmus, agar manitol, urea y reducción de nitratos. Los fundamentos y procedimientos de las pruebas realizadas se presentan a continuación.

❖ *Tinción de Gram*

Las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas tiñeron de forma distinta debido a las diferencias constitutivas en la estructura de sus paredes celulares.

- Se realizó un frotis de la muestra y se fijó al calor
- Se agregó el reactivo cristal violeta y se esperó 1 minuto. Todas las células Gram positivas y Gram negativas se tiñen de color azul-púrpura.
- Se enjuagó con agua.
- Se agregó lugol y se esperó 1 minuto.
- Se enjuagó con agua.
- Se agregó alcohol- acetona y se esperó de 8 a 15 segundos aproximadamente (parte crítica de la coloración).
- Se enjuagó con agua.
- Se agregó el reactivo safranina por 45 segundos. Este tinte dejará de color rosado-rojizo las bacterias Gram negativas.
- Se enjuagó con agua y se dejó secar a temperatura ambiente
- Se observó al microscopio a 100x con aceite de inmersión. ⁽⁴⁶⁾

❖ *Tinción de Wirtz- Conklin*

Las esporas son la forma de resistencia de las bacterias, tienen forma esférica u oval. Se preparó los frotis bacterianos se tiñó con verde malaquita. Con unas pinzas de madera se colocó la muestra encima de la llama del mechero para que el colorante humee, pero sin que hierva, durante 5 min. Se añadió más colorante si es necesario. Se lavó con agua el resto de colorante, se tiñó con

safranina 1 min. Se lavó con agua el resto de colorante, se secó la preparación y se observó al microscopio. La tinción tiñe las células vegetativas de color rosa, mientras que las esporas permanecen verdes.⁽⁴⁷⁾

❖ *Medio Agar Sangre*

Muchos microorganismos son capaces de crecer en agar sangre y cuando lo hacen responden de diferente manera según realicen o no la lisis de los glóbulos rojos (hemólisis) producida por la acción de una enzima llamada hemolisina

Se suspendió 40 g del polvo por litro de agua destilada, se dejó reposar 5 minutos y se mezcló perfectamente hasta obtener una suspensión homogénea. Se calentó con agitación frecuente por 1 minuto. Se esterilizó 20 minutos a 121°C. Se enfrió a 45-50°C se agregó sangre desfibrinada al 5% a temperatura ambiente, se homogenizó y procedió a distribuir el medio en las placas

Se realizó una siembra del cultivo puro mediante la técnica del agotamiento de asa en placa de agar sangre. Después de las 24 horas de incubación se observó la presencia de halos de hemólisis alrededor de las colonias y se identificó el tipo de hemólisis.⁽³⁷⁾

❖ *Prueba de la Catalasa*

La catalasa es una enzima que descompone el peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua.

Con un asa de siembra en punta se colocó en el centro de una placa porta objetos la colonia a investigar. Se agregó 1 a 2 gotas de peróxido de hidrógeno. Se suspendió el organismo y se observó si existe presencia de burbujas. La rápida aparición y producción sostenida de burbujas de gas o efervescencia indicó una reacción positiva.⁽⁴⁸⁾

❖ *Prueba de la Oxidasa*

El objetivo de la prueba “Oxidasa” fue buscar la presencia de la enzima Citocromo C oxidasa.

Se impregnó un pequeño papel de filtro con reactivo de Kovacs; Con un asa de siembra se tomó el microorganismo y se frotó sobre el papel. Tras unos 30 segundos, se observó si ocurrió algún cambio. Las bacterias que dieron positivo a esta prueba tienen generalmente un ciclo respiratorio oxidativo. La prueba se consideró positiva si se desarrolla un color púrpura en el papel. ⁽⁴⁸⁾

❖ *Prueba de la Ureasa*

Esta prueba detecta la presencia de la enzima ureasa en los microorganismos a través de una prueba en la que se observó la alcalinización del medio.

Se suspendió 3,87 g del medio deshidratado por cada 100 ml de agua destilada. Se disolvió sin calentar y esterilizó por filtración. Se distribuyó en tubos pequeños estériles, entre 0,5 y 2 ml, con una asa de siembra se tomó muestra y se sembró por picadura el microorganismo en tubo, se incubó a 37°C hasta detectar cambio de color del indicador. La prueba se consideró positiva si el color cambiaba a púrpura debido al indicador rojo fenol. ⁽⁴⁸⁾

❖ *Prueba TSI (Triple Sugar Iron ó Triple Azúcar Hierro)*

El TSI es un medio nutritivo y diferencial que permitió estudiar la capacidad de producción de ácido y gas a partir de glucosa, sacarosa y lactosa en un único medio.

Se suspendió 62,5 g del polvo por 1 litro de agua purificada. Se dejó reposar 5 minutos. Se calentó con agitación frecuente por 1 o 2 minutos hasta homogenizarlo, se distribuyó en tubos, llenándolos con un volumen que ocupe hasta la tercera parte de los mismos. Se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 minutos. Se enfrió y dejó solidificar el agar en pico de flauta profundo.

Se inoculó los microorganismos aislados en tubos con medio TSI inclinado para eso se introdujo la punta hasta 3 a 5 mm. Del fondo del tubo. Después de retirado el alambre del fondo, se estiró el pico con un movimiento hacia uno y otro lado, Se incubó a 35°C durante 24 horas. ⁽³⁷⁾

❖ *Prueba del O/F (oxidación-fermentación)*

Se suspendió 9,8 g del medio basal de Hugh-Leifson por litro de agua destilada, se calentó con agitación frecuente por 1 minuto. Se esterilizó a 121°C durante 15 minutos. Por 100 ml de base estéril, se agregó 10 ml de la solución estéril de glucosa al 10%

Se inoculó dos tubos del medio de cultivo semisólido se realizó una siembra en picadura, a uno de ellos se le añadió una pequeña cantidad de parafina estéril, y se llevó a incubar ambos a 37°C durante 24 horas. Si la vía es la oxidativa, solamente el tubo abierto vira ligeramente en la parte superior a color amarillo. Si la vía es la fermentativa hay un viraje intenso a amarillo que comienza en el fondo de los dos tubos. ⁽³⁷⁾

❖ *Reducción de nitratos*

Con esta prueba se investigó la capacidad de las bacterias para reducir los nitratos convirtiéndolos en nitritos o en nitrógeno, es decir se estudió la presencia de nitrato reductasa y nitrito reductasa.

Se suspendió 9 g de caldo nitrado (anexo 3) por litro de agua destilada, se calentó hasta disolver y distribuyó en tubos de 10 mm de diámetro, 10 ml por tubo. Se esterilizó a 121°C durante 15 minutos, se inoculó introduciendo el asa bacteriológica con la carga de bacterias, se incubó a 37°C durante 24 horas y tras la incubación se añadió dos gotas de los reactivos A (ácido sulfamínico al 0.8% en ácido acético glacial 5N) y B (α -naftilamina al 0.5% en ácido acético glacial 5N). Si los nitratos han sido reducidos, el caldo de cultivo vira a un color rojo intenso por la presencia de nitritos, ⁽³⁷⁾

❖ *Agar McConkey*

El agar MacConkey es un medio selectivo y diferencial para la detección de organismos coliformes y patógenos entéricos. Este medio es ligeramente selectivo ya que la concentración de sales biliares, que inhiben el crecimiento de los microorganismos Gram positivos, es baja en relación con otros medios similares. Se incluyó también cristal violeta para inhibir el crecimiento de las bacterias Gram positivas, especialmente estafilococos y enterococos.

El medio requirió de 50 g del polvo por litro de agua destilada. Se reposo 5 minutos y mezcla hasta uniformar, se calentó suavemente por 1 a 2 minutos hasta disolver, se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Se inoculó las placas por estría, asegurándose que se tengan colonias aisladas, se incubó las placas a 37 °C durante 18 a 24 horas. Los resultados presentan colonias lactosa (-): incoloras y colonias lactosa (+): rosa/rojo ladrillo rodeadas de un halo de sales biliares precipitadas. ⁽³⁷⁾

❖ *Caldo Tioglicolato*

Es el caldo de enriquecimiento más utilizado en Microbiología. Contiene 0,075 % de Agar para evitar que las corrientes de convección transporten el oxígeno de la superficie a toda la masa del caldo. El ácido tioglicólico actúa como agente reductor, disminuyendo aún más el potencial de óxido-reducción del medio.

El medio requirió de 30 g del polvo por litro de agua destilada. Se dejó reposar 5 minutos, se calentó a ebullición hasta disolver, se distribuyó, esterilizo a 121°C por 15 minutos. El tubo fue inoculado con un asa de punta y se incubo a 37°C hasta que se produce su crecimiento.

Identificando su dependencia de oxígeno de acuerdo al crecimiento en los tubos por medio de la turbidez.. ⁽⁴⁹⁾

❖ *Prueba Litmus Milk*

Litmus Milk es un medio versátil porque hay muchas reacciones que se pueden obtener de él. El indicador Litmus cambia de color según el pH. Cuando hay presencia de ácidos cambia a color rojo y a color violeta cuando hay bases.

Se Usó una técnica aséptica, se inoculó cada tubo con Leche desnatada al 10% con litmus (azolitmin) como indicador de pH se sembró el microorganismo asignado, se colocó los tubos a 37°C por 24 horas. Al cabo de las 24 horas se examinó los tubos y se anotó los resultados. ⁽⁵⁰⁾

❖ *Medio gelatina Nutritiva*

La gelatina es el sustrato para determinar la capacidad de un microorganismo de producir enzimas de tipo proteolítico (gelatinasas), que licúan la gelatina.

Se Incubo un caldo con 12% de gelatina, se esterilizo durante 20 minutos a 120 °C, Se usó una técnica aséptica, se inoculo cada tubo con el microorganismo asignado, se incubo a 37°C por 48 h. Se revisó los tubos diarios para registrar la hidrólisis de la molécula proteica por acción de la gelatinasa. La licuefacción se comprobó sumergiendo los tubos en agua helada o refrigeración, si hay licuefacción no solidifico el medio. Se evitó agitar los tubos en tanto su contenido permanezca líquido. ⁽⁴⁸⁾

❖ *Prueba de Motilidad*

La motilidad se puede observar por un crecimiento turbio lejos de la picadura realizada en la inoculación de los medios OF, este método es de confianza variable ya que la picadura se pudo haber hecho chueca o irregular lo que nos darían falso positivo. Para evitar este factor se realizó la técnica de gota suspendida bacteriana.

Se agregó sobre un portaobjetos una gota de solución fisiológica salina estéril, se puso un poco de muestra bacteriana, se homogenizo de tal forma que la gota no se extienda mucho, se puso un cubreobjetos al que previamente se le puso una base de 4 bolitas pequeñas de plastilina con el objetivo de evitar que aplaste totalmente la gota con bacteria, finalmente se observó al microscopio con un objetivo de 40X. Se considera motilidad positiva, si se alcanza a ver bacterias muy pequeñas y casi translúcidas moverse a velocidad variable, y si se observa al menos de 5-10 bacterias recorrer todo el campo del microscopio ⁽⁴⁸⁾

❖ *Prueba de indol*

Es una prueba bioquímica realizada en especies bacterianas para determinar la habilidad del organismo de romper el indol del aminoácido triptófano. ⁽⁶⁰⁾

El cultivo bacteriano se sembró en caldo peptonado estéril por 24 a 48 horas, Luego de la incubación, se añadió cinco gotas de reactivo Kovac (alcohol isoamilo, *p*-dimetilaminobenzaldehído y ácido clorhídrico concentrado) al caldo del cultivo. Los resultados positivos da la presencia de un color rojo o rojo-violeta en la superficie de la capa de alcohol en el cultivo y un resultado negativo se muestra amarillo. ⁽⁴⁸⁾

❖ *Medio Manitol Salado*

Se trató de un medio altamente selectivo debido a su alta concentración salina. Las bacterias que crecen en un medio con alta concentración de sal y fermentan el manitol, producen ácidos, con lo que se modifica el pH del medio y vira el indicador de pH del color rojo al amarillo.

Se requirió 111 g del medio en un litro de agua destilada se calentó con agitación suave hasta su completa disolución y se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos se dejó enfriar a una temperatura entre 45-50 °C se preparó en tubo con agar recto la siembra se realizó en placa por estría, se incubó a 37°C durante 24 horas y se anotó los resultados. ⁽³⁷⁾

3.3.6. Obtención de la muestra proveniente a la punta de bombón (MP)

La segunda toma de muestra se realizó en el distrito de Punta de Bombón, provincia de Islay, departamento de Arequipa, y corresponde a un pozo de captación para potabilización de agua, ubicado geográficamente a una latitud sur de 17°10'5.52", y longitud oeste de 71°47'35.89"O a 24 m.s.n.m.; esta muestra (MP) fue utilizada para la prueba del Sistema.

Para la toma de muestra se siguió el protocolo que indica la Norma Técnica Peruana NTP-ISO 5667-5:2001 el caño de la fuente de salida fue abierto y se dejó correr por aproximadamente 5 minutos, se utilizó 2 botellas de plástico de 5 litros de volumen, las botellas fueron 3 veces cebadas con el agua de muestra, y llenadas completamente.

Se esterilizo previamente las botellas enjuagadas y dejadas en ácido nítrico para eliminar trazas de sustancias y enjuagadas tres veces con agua destilada.⁽⁵¹⁾

❖ *Transporte*

La muestra estuvo protegida y sellada herméticamente de tal forma que no se deteriore y que no se pierda nada de su contenido durante el transporte. El embalado protegió al recipiente de una posible contaminación externa y rotura particularmente cerca de la tapa, la muestra se mantuvo fresca y protegida de la luz, no se añadió conservantes, ya que la muestra fue analizada antes de las 24 horas de haber sido recolectada. La muestra fue transportada usando un cooler.

❖ *Almacenamiento*

La muestra se mantuvo en la oscuridad a una temperatura menor que en el momento del muestreo, los recipientes se llenaron pero no por completo para almacenar la muestra.

La muestra proveniente de la punta de bombón (MP) para la caracterización fisicoquímica se almaceno en un refrigerador de -20°C permitiendo un periodo de almacenamiento largo.

3.3.7. Caracterización Fisicoquímica de aguas crudas de la muestra de aguas subterráneas de punta de bombón (MP)

❖ *Determinación de Arsénico.*

Para la determinar la concentración de arsénico inicial en agua subterránea y antes de entrar al sistema MBBR, a la muestra MP se le adicionó 1ppm de arsenito de sodio a la muestra para potenciar la acción del consorcio bacteriano a usarse en el sistema, posteriormente se tomó tres muestra MP1,MP2 y MP3,las cuales fueron enviadas al laboratorio de control de calidad, de la Universidad Católica de Santa María, donde se usó el método de espectroscopia de emisión atómica – ICP, siguiendo el procedimiento del método EPA 200.7.⁽⁵²⁾

Se debe considerar que tras obtener los resultados de concentración inicial se debió corregir el dato restándole 1ppm.

La espectroscopía de emisión atómica por plasma de acoplamiento inductivo (AES-ICP o también referenciada como OES-ICP), se fundamenta en el análisis de la radiación ultravioleta-visible característica de cada elemento químico, emitida durante su relajación tras haber sido excitado por el contacto con un plasma (gas ionizado generalmente argón, altamente energético).

El plasma tiene realmente dos roles: el primer paso consiste en la atomización de la muestra a ser analizada, con el propósito de obtener átomos libres, usualmente en el estado fundamental; el segundo consiste en la excitación de los átomos a estados de energía superiores.

La radiación ultravioleta visible captada genera espectros de líneas que son específicos de cada elemento y la adecuada selección de una línea y su aislamiento por medio de un sistema dispersivo permite al analista verificar la presencia de ese elemento y determinar su concentración.

Un espectrómetro de emisión atómica mediante plasma inductivo de argón consiste en una fuente de radiación, un sistema de introducción de la muestra, un sistema óptico dispersivo, un detector y la correspondiente electrónica para adquisición, procesamiento y edición de resultados.⁽⁷⁾

Se determinó la caracterización fisicoquímica de la muestra del agua de punta de bombón (MP) inicial (a las 0 horas de tratamiento). Los ensayos fueron realizados en el laboratorio de control de calidad de SEDAPAR. , se usó los métodos descritos a continuación:

❖ *Determinación de pH por el método electrométrico (INDECOPI)*

Se basa en NTP 214.029:2000.⁽⁵³⁾, se utilizó el pH metro modelo mv/OPR Melder Toledo previamente calibrado a pH 4 y pH 7, se agitó cuidadosamente la muestra, se lavó el electrodo con agua destilada, se sumergió dentro de la muestra, se registró el pH y la temperatura de la muestra.

❖ ***Determinación de conductividad, sólidos totales y porcentaje de salinidad (SUNASS)***

El método fue modificado del descrito en el manual de procedimientos de análisis de agua de SUNASS. ⁽⁵⁴⁾ Se utilizó el conductímetro modelo Melter Toledo, previamente calibrado con un estándar de conductividad y sólidos totales de 1413 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (692 ppm NaCl) de la marca Thermo Scientifics, se lavó el sensor con agua destilada y se sumergió dentro de la muestra, se registró la conductividad, sólidos totales y porcentaje de salinidad de la muestra.

❖ ***Determinación de turbidez por el método nefelométrico (INDECOPI)***

El método utilizado fue el descrito por la norma peruana técnica NTP 214.006:1999. ⁽⁵⁵⁾ Se determinó la turbidez de las muestras a través de un turbidímetro de escala expandida marca HATCH modelo 2100N y se comprobó que el tiempo de calibración del equipo a usar sea menor a 3 meses. Se agitó cuidadosamente la muestra, se vertió la muestra en la celda de medición observando que no presente huellas de suciedad ni burbujas. Se colocó la celda en el turbidímetro y se anotó la lectura directamente.

❖ ***Determinación de dureza Total por el método titulométrico con EDTA (SUNASS)***

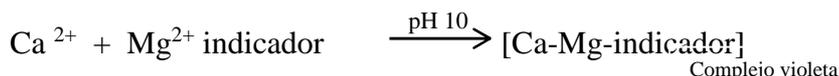
El método usado fue modificado del descrito en el manual de procedimientos de análisis de agua de SUNASS. ⁽⁵⁴⁾ Se hizo una dilución de 10 ml de muestra con 40 ml de agua desionizada enrasada a una fiola de 50 ml se pasó a un matraz de 250 ml, se agregó 1ml de buffer de dureza, 0,25g de cianuro de calcio 0,5 g de negro de eriocromo de T y se tituló con EDTA 0,01M.

Para la preparación del buffer de dureza, se pesó 3,4 g de cloruro de amonio se agregó 28,5 ml de hidróxido de amonio y se disolvió. En una campana de extracción se agregó 10 ml de agua desionizada, para evitar los vapores de amoníaco, se midió el pH del amortiguador, se ajustó a pH 10, se pasó a una fiola y se enrazó a 50 ml.

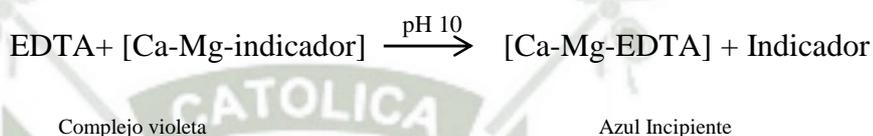
El factor volumétrico de la solución de EDTA (f) fue calculado titulando 20 ml de la solución estándar de CaCO₃ como se describe en este apartado, el resultado fue expresado como mg de CaCO₃ por ml de EDTA.

Las reacciones química que fundamentan este método son las siguientes:

(Reacción 1)



(Reacción 2)



La dureza se determinó con el vire de violeta a azul incipiente, se hizo el siguiente cálculo de acuerdo a la formula N° 1.

$$\text{mg CaCO}_3/\text{l} = \frac{(A-B) \cdot f \cdot 1000}{\text{ml muestra}} \quad (\text{Formula 1})$$

Dónde:

(A-B)= gasto real de la solución de EDTA, en ml

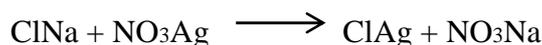
f= factor volumétrico de la solución EDTA.

❖ *Determinación de cloruros por el Método Argentométrico (INDECOPI)*

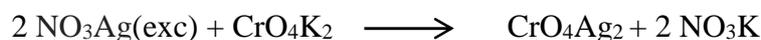
El método e basa en el método de Mohr, El método seguido tiene como referencia la NTP 214.021:1988. ⁽⁵⁶⁾Se hizo una dilución de 10 ml de muestra con 40 ml de agua desionizada enrasada a una fiola de 50 ml se pasó a un matraz, se agregó 1 ml de cromato de potasio al 10 % y se tituló con nitrato de plata 0,0141N

Las reacciones químicas que fundamentan este método son las siguientes:

Reacción de valoración: (*Reacción 3*)



Reacción indicadora: (*Reacción 4*)



Amarillo brillante

mostaza lechoso

La dureza se determinó con el vire de color amarillo brillante a un mostaza lechoso (que se presenta con la formación del color rojo ladrillo del cromato de plata) y se realizó el siguiente cálculo de la fórmula 2.

$$\text{mg Cl}^-/\text{L} = \frac{(A - B) * N * 35,450 * 1000}{\text{ml muestra}} \quad (\text{Formula 2})$$

Dónde:

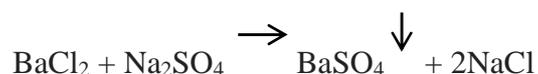
(A-B)= gasto real de la solución de AgNO_3

N= normalidad de la solución de AgNO_3

❖ *Determinación de Sulfatos por el Método Turbidimetrico (INDECOPI)*

El método se realizó de acuerdo a la norma técnica peruana NTP 214.023:2000. ⁽⁵⁷⁾ Se hizo una dilución de 10 ml de muestra con 40 ml de agua desionizada enrasada a una fiola de 50 ml se pasó a un matraz, se agregó 20 ml de solución amortiguadora de sulfatos 0,2 mg de cloruro de bario se esperó aproximadamente un minuto y se leyó en el turbidímetro, La reacción química que fundamenta este método es la siguiente:

(*Reacción 5*)



Con la reacción 5 se obtuvo sulfato de bario insoluble que da un precipitado blanco y permite medir la turbidez.

Para la preparación de la solución amortiguadora de sulfatos, se disolvió 250 ml de agua destilada 15 g de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 1,51 g de Acetato de Sodio anhidro 0,5 g de KNO_3 y 10 ml de Ácido Acético 99%, se transfirió a una fiola de 500 ml y se enraso con agua destilada.

Se hizo una curva de calibración de sulfatos para lo cual se preparó soluciones con: 0, 5, 10, 15, 20 y 25 ppm de SO_4^{-2} y se añadió cloruro de bario y se midió la turbidez con los resultados se elaboró una ecuación de regresión lineal para determinar la concentración de SO_4^{-2} . La concentración obtenida se multiplico por el factor de dilución (5).

$$SO_4^{-2} = Tb * 0.2942 + 0.1751 \quad (\text{Formula 3})$$

3.3.8. Diseño del sistema MBBR para biodepuración de Arsénico en agua

El sistema MBBR es un reactor de biopelícula de lecho móvil se caracteriza porque utilizar gran volumen del reactor para el crecimiento de la biomasa bacteriana, en el cual la biopelícula se encuentra protegida en el interior de un soporte plástico, diseñados especialmente con una elevada superficie interna. Estos soportes plásticos se encuentran en suspensión, en continuo movimiento, en un determinado volumen de reactor y completamente distribuidos por toda la fase líquida, sin necesidad de recirculación del lodo. El diseño del biosoporte es importante debido a los requerimientos de transferencia del sustrato y de oxígeno a los microorganismos.

Este sistema MBBR es ampliamente usado para la depuración de aguas residuales por lo cual elegimos este tipo de biorreactor MBBR para utilizarlo en la depuración de arsénico en aguas subterráneas de Punta de Bombón.

En una primera etapa se realizó el diseño y se adquirió materiales y equipos.⁽³¹⁾ El material seleccionado fue el acrílico. Se determinó la ubicación y el diámetro del punto de entrada de aire, el punto de alimentación, el punto de toma de muestras.

- Sistema de aireación: se diseñó un sistema de aireación usando un difusor ubicado en la parte inferior del reactor y aire comprimido.
- Sistema de alimentación incluye el sistema de bombeo, la red de tuberías y el sistema de almacenamiento de entrada.
- Sistema de lecho móvil: Para la selección del lecho móvil se realizó un estudio bibliográfico de los diferentes materiales que podrían utilizarse para la formación de biopelículas. Se seleccionó el polietileno de alta densidad como soporte móvil. El soporte utilizado tuvo las siguientes características: Alto: 0,7 cm, Diámetro: 1cm, Superficie específica: $500 \text{ m}^2 / \text{m}^3$.

En la segunda etapa se construyó y ensambló los elementos diseñados.

- Ensamblaje de la estructura del reactor: se acondicionó el lugar donde se ubicó el reactor. Se ensambló la estructura externa del reactor en el lugar acondicionado adecuadamente siguiendo las especificaciones del diseño.
- Instalación de sistema de aireación: se instaló las tuberías y conexiones para alimentación del aire proveniente del compresor al reactor. La tubería y conexiones para la entrada de aire fueron de plástico, las mangueras utilizadas tuvieron un diámetro de 0,5 cm.
- Alimentación: el reactor fue alimentado utilizando una bomba, la cual succiono el agua del tanque de alimentación.
- Puesta en funcionamiento del reactor: Para verificar el correcto funcionamiento del reactor, se procedió al suministro de agua subterránea del distrito de la Punta de Bombón y se estableció los parámetros de operación, se llevó un control de la calidad de efluente obtenido. La configuración experimental del sistema se muestra en la figura 6.

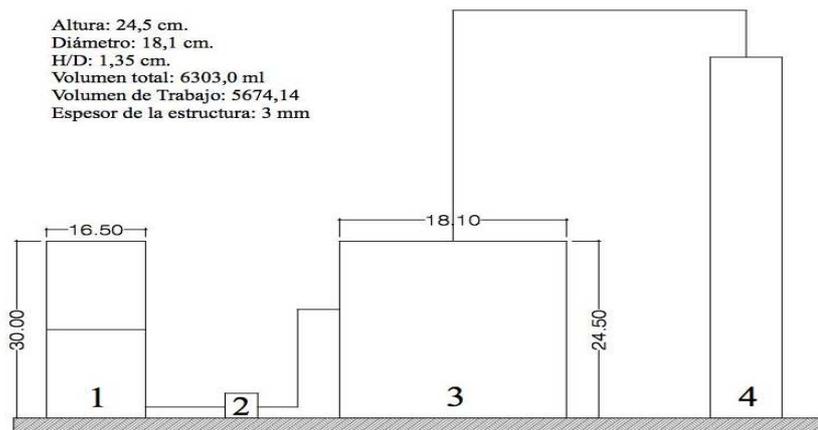


Figura 6: Configuración experimental del sistema: (1) tanque de almacén de agua. (2) Bomba dosificadora. (3) reactor MBBR. (4) Tanque presurizado ⁽³¹⁾

Al finalizar la operación del sistema, este fue desacoplado. El lavado de los soportes se realizó de manera mecánica usando agua potable, los desechos obtenidos fueron almacenados de forma segura y se recomendó su tratamiento para la recuperación de sales arsenicales.

3.3.9. Evaluación del sistema

Como afluente se utilizó agua subterránea proveniente de Punta de Bombón, a la cual se añadió 1 ppm de arsenito de sodio. Se midió la concentración de arsénico (ppm) de la muestra inicial (tiempo 0) y a las 5, 10, 24 horas de tiempo de retención, se realizó el muestreo por triplicado.

3.3.10. Determinación de la cinética de cultivos resistentes

Para realizar las pruebas de cinética se usó caldo nutritivo suplementado con 200 ppm de arsenito de sodio, se realizó un inóculo inicial, a partir de colonias con resistencia a 1200 ppm de As(III). Este primer inóculo se preparó añadiendo 1000 μ l de la colonia diluida en 10 ml de caldo nutritivo, a lo cual se añadió 200 ppm de arsenito de sodio y se dejó en un shaker a 37 °C y 40 rpm durante 24 horas.

Posteriormente se preparó para cada colonia 40 ml de caldo nutritivo con 200 de arsenito de sodio, el cual se dividió en 2 matraces 1 para hacer la cinética de las primeras horas y el otro para hacer la cinética de las últimas horas Para el primer matraz se tomó del primer inóculo 1000 μ l para 25 ml de

caldo , y se colocó en el shaker a 37 °C y 40 rpm tomándose 3 ml de muestra para cada tiempo propuesto; para el segundo matraz se añadió 600 µl para 15 ml y se dejó en el shaker 37 °C y 40 rpm para comenzar a medir los 3 últimos tiempos de muestreo al día siguiente. Los tiempos de toma de muestra fueron :0 ,5,1,2,4,8,12,16,24 horas.

Se guardó las muestras en a -4°C y posteriormente de evaluó su concentración usando espectrofotometría, se usó como longitud de onda 560 nm usando como blanco caldo nutritivo suplementado con 200 ppm de Arsenito de sodio. ⁽⁵⁸⁾

3.3.11. Obtención de la biomasa

A partir de los cultivos obtenidos en la prueba de resistencia en placa se preparó 350 ml de inóculos y se dejó incubar a 37 ° C por 48 horas

Se utilizó como lecho móvil soportes de polietileno de alta densidad. Para la formación de la biopelícula se colocó los soportes en un semillero contenía 1700 ml de caldo nutritivo previamente autoclavado y se dejó incubar por 4 semanas. El semillero el cual fue construido en base a un frasco de vidrio, una tapa y mangueras de plástico que permitieron el ingreso de aire comprimido para oxigenación y circulación de los soportes , así como la salida de aire para contrarrestar la presión. Todos los elementos fueron esterilizados antes de iniciar el proceso.

El pretratamiento para los soportes consistió en darles mayor rugosidad para lo cual se usó una lima circular, asimismo los soportes fueron sumergidos durante 24 horas en una solución de Arsenito de sodio con concentración de 150 ppm.

3.3.12. Caracterización fisicoquímica de las aguas biodepuradas a la salida del sistema MBBR.

Se analizó las muestras después de 24 horas tratamiento en el sistema, siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.3.7.

3.3.13. Análisis Estadístico

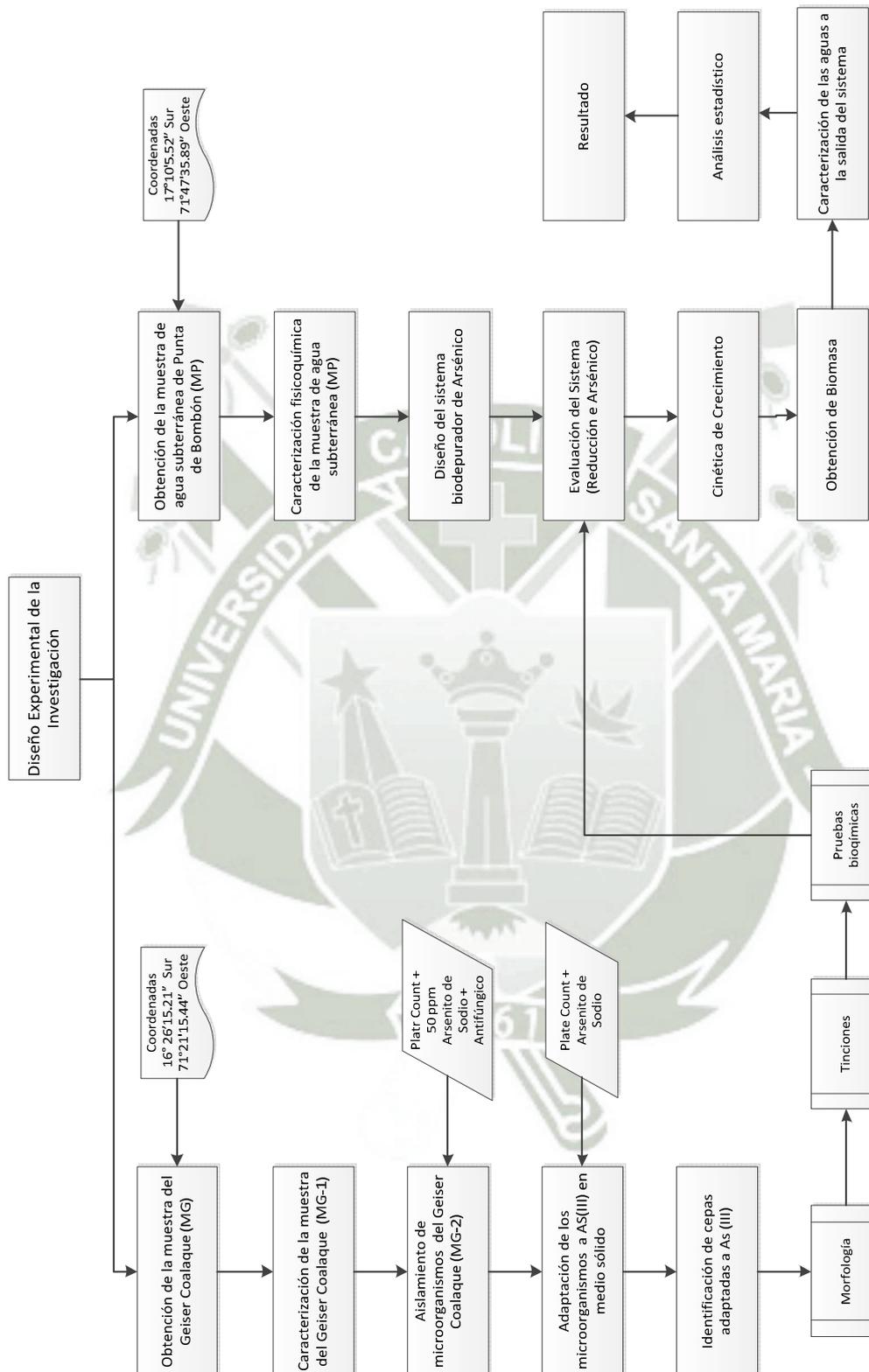
Los cálculos estadísticos fueron realizados utilizando el programa computacional SPSS Statgraphics 19. Un valor de $P < 0,05$ fue considerado significativo.

Se aplicó un análisis de varianza (ANOVA), para evaluar los resultados obtenidos en Evaluación de la biodepuración de arsénico en el agua subterránea, para este análisis se consideró las siguientes hipótesis:

H0: Las medias obtenidas para cada tiempo de retención son iguales

H1: Al menos dos medias obtenidas para cada tiempo de retención son distintas

Se realizó la prueba de hipótesis para una variable, a través de la comparación de medias, para evaluar las características fisicoquímicas del agua subterránea de punta de bombón antes y después del tratamiento.



CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. OBTENCIÓN DE MUESTRAS DEL GEISER COALAQE (MG)

Las muestras del Geiser Coalaque MG-1 y MG-2 se muestran en la figura 7, donde se aprecia las características de los frascos de muestreo utilizados, de acuerdo a los requerimientos de la metodología.

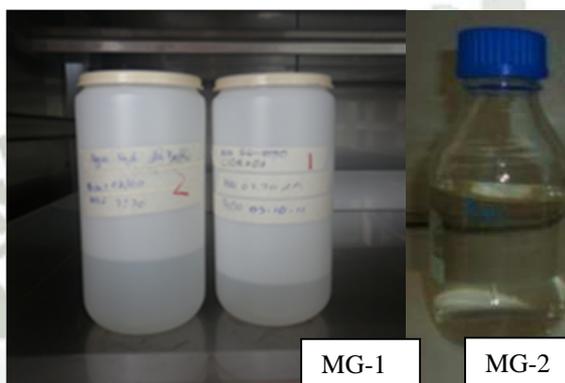


Figura 7: Muestra fisicoquímica y microbiológica del geiser Coalaque. (MG-1) muestra fisicoquímica, (MG-2) muestra microbiológica.

Los geiseres son manantiales calientes con temperaturas muy cercanas al punto de ebullición del agua, que brotan de la tierra a alta presión y es conocido que mayor parte de los acuíferos con contenidos altos de arsénico tienen un origen ligado a procesos geoquímicos naturales.⁽⁵⁹⁾ Es por ello que los geiseres son una fuente importante de agua con altas concentraciones de arsénico

En la figura 8 se observa el Geiser Coalaque del cual se realizó la toma de la muestra. Este geiser junto con otros ubicados en las inmediaciones son afluentes del río Vagabundo, es cual es conocido por sus altas concentraciones de arsénico.



¹. Punto del que se realizó el muestreo directo

Figura 8: Muestreo en el geiser Coalaque. (a) Vista panorámica de la fuente formada por las aguas del geiser, (2) Geiser Coalaque

La muestra tomada fue transportada y almacenada, no se usó preservantes debido a que el análisis se llevó a menos de 24 horas de tomada la muestra ⁽⁸⁾, asimismo el periodo de almacenamiento fue 12 horas, por lo que las muestras obtenidas fueron completamente viables.

4.2. CARACTERIZACIÓN DE LA MUESTRA DEL GEISER COALAUQUE (MG-1) EN ARSÉNICO

El método usado fue la Espectroscopía de Absorción Atómica Acoplado a la Generación de Hidruros se fundamenta en que el arsénico forma hidruros covalentes volátiles por reacción con el borohidruro de sodio en solución ácida, y su generación como gas permite que sean transferidos a una celda de cuarzo calentada a 900 °C donde se produce la disociación y atomización de los mismos ⁽⁷⁾, de esta manera por espectroscopia se analizó cuantitativamente la concentración de arsénico en muestra acuosa.

En el Geiser Coalaque se encontró una concentración de 24,2 ppm de Arsénico. En general, los valores de fondo de concentración de arsénico en aguas subterráneas son, para la mayoría de los casos, inferiores a 0,01 ppm ⁽⁵⁹⁾ y los valores citados en la literatura para aguas en condiciones naturales definen un rango muy amplio entre <0.0005 y 5 ppm⁽⁶⁰⁾; sin embargo la concentración de Arsénico natural conocida más alta en agua geotérmica es 126 ppm del manantial de Sogdoi al este de la meseta de Qinghai-Tíbet.⁽⁶¹⁾ Dado que las aguas subterráneas de origen geotérmico como geiseres presentan altas concentraciones

de arsénico se presumió que bacterias aisladas del geiser Coalaque presenten altas resistencias y afinidad a este metal.

4.3. AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS DE LA MUESTRA DEL GEISER COALAQUE (MG-2)

❖ *Siembra*

Para la siembra se utilizó el método de dilución, para lo cual se preparó las diluciones correspondientes las cuales se observan en la figura 9. Las diluciones fueron preparadas usando agua de dilución, preparada en base a un buffer fosfato y una solución de cloruro de magnesio, el agua de dilución permitió que los microorganismos se mantengan en condiciones isotónicas hasta el momento de ser sembrados.



Figura 9: Muestra microbiológica (MG-2) y 6 diluciones preparadas

Se sembró en medio TSA las diluciones D0, D2, D4, D6, como se observa en la figura 10; el medio TSA es un medio utilizado para propósitos generales, favorece el desarrollo y aislamiento de una gran variedad de microorganismos aerobios, y anaerobios facultativos y estrictos. La peptona de caseína y la peptona de soya aportan nutrientes ricos en péptidos, aminoácidos libres, bases púricas y pirimídicas, minerales y vitaminas. La peptona de soya aporta también carbohidratos que estimulan el crecimiento de muchos microorganismos. El cloruro de sodio mantiene el balance osmótico.⁽⁶²⁾ Este medio aseguró la obtención de un amplio rango de microorganismos

Luego del periodo de incubación se observó que en todas las placas, correspondientes a las diluciones D0, D2, D4, D6 había presencia de colonias de color crema o blanco y de aspecto liso o cremoso, se seleccionó 5 colonias de

las placas correspondientes a la dilución D6, las cuales fueron resembradas y denominadas como CAs1, CAs2 CAs3, CAs4, CAs5.



Figura 10: Siembra por triplicado de las diluciones D0, D2, D4, D6.

❖ **Resiembra.**

En la resiembra el medio Plate Count permitió obtener colonias más definidas y con mayor separación, pudiéndose observar las características morfológicas de las colonias ⁽⁶³⁾ como se presenta en la Tabla N° 7 y en las figuras figura 11 y 12. Cabe resaltar que la colonia CAs4 no presentó crecimiento, por lo cual fue excluida del estudio.

Tabla 7: Morfología de Colonias Resembradas ¹

Nombre de colonia	Morfología de Colonia			
	Color	Forma	Borde	Superficie
CAs1	Blanquesina Cremosa	Circular Fusiforme	Redondeados	Convexa
CAs2	Blanca traslúcida	Puntiforme	Ondulado	Plana
CAs3	Blanquesina	Fusiforme	Redondeado	Plana
CAs5	Blanca cremosa	Irregular	Ondulado	Convexa

^{1.} Según la referencia bibliográfica ⁹

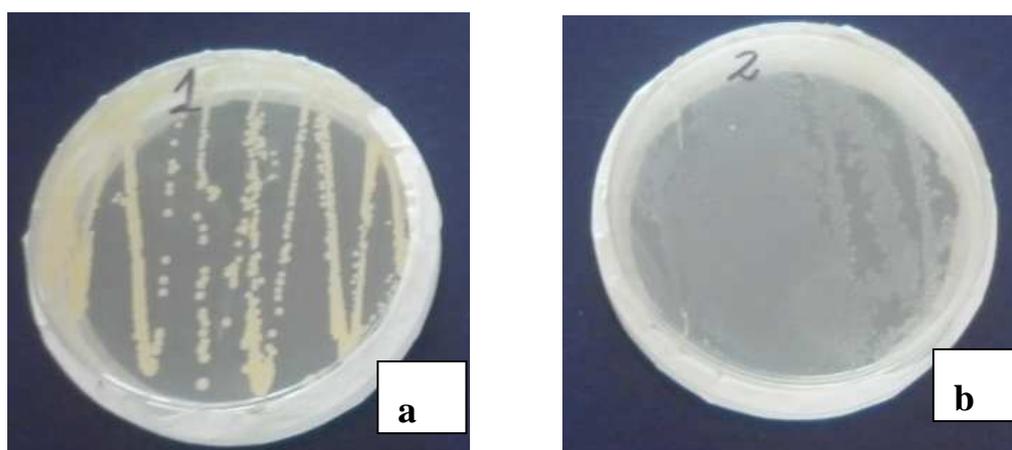


Figura 11: Características morfológicas de las colonias CAs1, CAs2. (a) CAs1, (b) CAs2

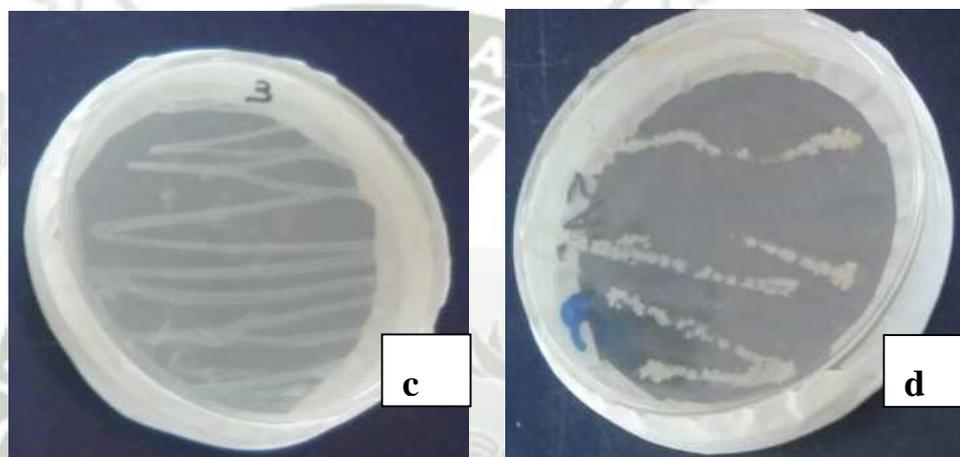


Figura 12: Características morfológicas de las colonias CAs3, CAs5. (c) CAs3, (d) CAs5

❖ *Obtención de cultivos puros y consorcios*

La tinción Gram realizada, permitió determinar las características morfológicas de las bacterias y diferenciar las colonias puras de las colonias mixtas, se obtuvo 3 cultivos puros, correspondientes a las cepas CAs2, CAs3, CAs5 y un cultivo mixto CAs1 el cual no pudo ser aislado y fue trabajado como consorcio.

4.4. ADAPTACIÓN DE LAS MUESTRAS DEL GEISER COALAQUE (MG-2) A ARSENICO (III) EN MEDIO SOLIDO.

Durante la evaluación de la adaptación o resistencia que presentaban las colonias al arsenito de sodio, se aumentó paulatinamente la concentración de

arsenito de sodio y se redujo la concentración de medio Plate Count, para así reducir la fuente de nutrientes del medio.

La evaluación además se realizó a los 3, 7, 14 y 21 días, para evaluar si el tiempo ejercía una variación en la resistencia que las colonias presentaban sobre el arsénico.

A los tres días de incubación de las colonias a 37 °C se observó que concentración inhibitoria mínima (CIM) para la colonia CAs2 fue 1600 ppm de arsenito de sodio con una concentración de medio Plate Count de 0,2563 % m/v (g/ml). Para la colonia CAs1 fue 2000 ppm de arsenito de sodio con una concentración de medio Plate Count de 0,2563 % m/v (g/ml). Para las colonias CAs3 y CAs5 fue 6000 ppm de arsenito de sodio con una concentración de medio Plate Count de 0,1281 % m/v (g/ml).

El medio Plate Count tiene una composición de Triptosa la cual provee aminoácidos y otros complejos de sustancias nitrogenadas, extracto de levadura que provee complejo de vitamina B⁽⁶⁵⁾, dextrosa y agar, ya que para la preparación de medios M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8 el medio Plate Count fue diluido para reducir la fuente de nutrientes, se tuvo que agregar agar-agar para obtener la concentración de 1,2 % para obtener la solidificación.

En la evaluación a los 3 días de incubación, como se muestra en la tabla 8, se observó que la colonia CAs1 presentó alta adaptación en los medios M1, M2, M3 y M4, en el medio M5 presentó mediana adaptación y en los medios M6, M7 y M8 no presentó adaptación. La colonia CAs2 presentó alta adaptación en los medios M1, M2 y M3; no presentó adaptación a los medios M4, M5, M6, M7 y M8. La colonia CAs3 presentó alta adaptación en los medios M1, M2, M3, M4, M5, M7 y no presentó adaptación a los medios M6 y M8. La colonia CAs5 presentó exactamente el mismo comportamiento que la colonia CAs3. En la tabla 27 del anexo 2 se observa las fotos de las placas evaluadas a los 3 días de incubación y sus correspondientes resultados.

Tabla 8: Crecimiento e las Colonias a los 3 Días de Siembra¹

	Colonia CA1	Colonia CA2	Colonia CA3	Colonia CA5
M1	+++	+++	+++	+++
M2	+++	+++	+++	+++
M3	+++	+++	+++	+++
M4	+++	---	+++	+++
M5	+-	---	+++	+++
M6	---	---	---	---
M7	---	---	+++	+++
M8	---	---	---	---

(+++) alta adaptación, (+-) mediana adaptación, (--) baja adaptación, (---) no presenta adaptación

En la evaluación, a los 7 días como se presenta en la tabla 9, se observó que la colonia CA1 presento alta adaptación en los medios M1, M2, M3 y M4, en el medio M5 presento mediana adaptación y en los medios M6, M7 y M8 no presento adaptación. La colonia CA2 presento alta adaptación en los medios M1, M2 y M3; en el medio M4, baja adaptación; no presento adaptación a los medios M5, M6, M7 y M8. La colonia CA3 presento alta adaptación en los medios M1, M2, M3, M4, M5, M7; mediana adaptación para el medio M6 y no presento adaptación al medio M8. La colonia CA5 presento alta adaptación en los medios M1, M2, M3, M4, M5, M7 y no presento adaptación a los medios M6 y M8.

Tabla 9: Crecimiento e las Colonias a los 7 días de Siembra ¹

	Colonia CA1	Colonia CA2	Colonia CA3	Colonia CA5
M1	+++	+++	+++	+++
M2	+++	+++	+++	+++
M3	+++	+++	+++	+++
M4	+++	+-	+++	+++
M5	+-	---	+++	+++
M6	---	---	+-	---
M7	---	---	+++	+++
M8	---	---	---	---

¹. (+++) alta adaptación, (+-) mediana adaptación, (--) baja adaptación, (---) no presenta adaptación

En la evaluación, a los 14 días como se presenta en la tabla 10, se observó que la colonia CAs1 presento alta adaptación en los medios M1, M2 , M3, M4 y M7, en el medio M5 presento mediana adaptación y en los medios M6 y M8 no presento adaptación. La colonia CAs2 presento alta adaptación en los medios M1, M2 y M3; en el medio M4, baja adaptación; no presento adaptación a los medios M5, M6, M7 y M8. La colonia CAs3 presento alta adaptación en los medios M1, M2, M3, M4, M5, M7; mediana adaptación para el medio M6 y M8. La colonia CAs5 presento alta adaptación en los medios M1, M2, M3, M4, M5, M7; baja adaptación al medio M8 y no presento adaptación al medio M6.

Tabla 10: Crecimiento e las Colonias a los 14 días de Siembra ¹

	Colonia CAs1	Colonia CAs2	Colonia CAs3	Colonia CAs5
M1	+++	+++	+++	+++
M2	+++	+++	+++	+++
M3	+++	+++	+++	+++
M4	+++	+--	+++	+++
M5	++-	---	+++	+++
M6	---	---	++-	---
M7	+++	---	+++	+++
M8	---	---	++-	+--

¹. (+++) alta adaptación, (++) mediana adaptación, (+--) baja adaptación, (---) no presenta adaptación

En la evaluación, a los 21 días como se presenta en la tabla 11, se observó que la colonia CAs1 presento alta adaptación en los medios M1, M2 y M3, M4, M5, M6, M7 y no presento adaptación al medio M8. La colonia CAs2 presento alta adaptación en los medios M1, M2 y M3; en el medio M4, baja adaptación; no presento adaptación a los medios M5, M6, M7 y M8. La colonia CAs3 presento alta adaptación en los medios M1, M2, M3, M4, M5, M6 y M7 ; mediana adaptación para el M8. La colonia CAs5 presento alta adaptación en los medios M1, M2, M3, M4, M5, M7; baja adaptación al medio M8 y no presento adaptación al medio M6.

Tabla 11: Crecimiento e las Colonias a los 21 días de Siembra ¹

	Colonia CA1	Colonia CA2	Colonia CA3	Colonia CA5
M1	+++	+++	+++	+++
M2	+++	+++	+++	+++
M3	+++	+++	+++	+++
M4	+++	+-	+++	+++
M5	+++	---	+++	+++
M6	+++	---	+++	---
M7	+++	---	+++	+++
M8	---	---	+-	+-

¹. (+++) alta adaptación, (++) mediana adaptación, (+-) baja adaptación, (---) no presenta adaptación

La colonia CA1 entre los 3 días de incubación y los 7 días (4 días) no presento variación en su adaptación, entre los 7 días y los 14 días (7 días) aumento su resistencia, creciendo del medio M5 al M7, es decir paso de tener alta adaptación en 2000 ppm de arsénico a tener alta adaptación en 2200 ppm; entre los 14 y 21 días (7 días) la colonia creció en los medios M5, M6 y M7. De esta manera se demostró que la colonia CA1 pasó de tener alta adaptación de un medio con 2000 a otro con 2200 en 18 días de incubación.

La colonia CA2 entre los 3 días de incubación y los 7 días (4 días) presento variación en su adaptación, pasando de tener alta adaptación al medio M3 a presentar baja adaptación al medio M4, la diferencia entre estos medios fue 400ppm de arsenito de sodio y 0,0854 g de medio Plate Count; entre los 7 días y los 14 días (7 días) no se presentó aumento en la adaptación, entre los 14 y 21 días (7 días) la colonia presento un aumento en la adaptación de baja a mediana en el medio M4. De esta manera se demostró que la colonia CA2 pasó de tener alta adaptación de un medio con 1200 a mediana adaptación a otro con 1600 en 18 días de incubación.

La colonia CA3 entre los 3 días de incubación creció en los medios M5 y M7 mientras que a 7 días de incubación (4 días de diferencia) creció

además en el medio M6, ya que la concentración de arsenito de sodio en el medio M6 es menor a la de M7, este resultado no es determinante; entre los 7 días y los 14 días (7 días) aumento su adaptación, pasando de tener alta adaptación en el medio M7 a tener mediana adaptación en el medio M8, es decir paso de tener alta adaptación en 2200 ppm de arsenito de sodio a tener mediana adaptación en 6000 ppm; entre los 14 y 21 días (7 días de diferencia) no se presentó diferencias en la adaptación. La colonia CAS3 paso de tener alta adaptación a un medio con 2200 ppm de arsenito de sodio a tener mediana adaptación a otro medio con 6000 ppm en 11 días de incubación.

La colonia CAS5 entre los 3 y a los 7 días de incubación creció en los medios M5 y M7 mientras que a 14 días de incubación (7 días de diferencia) aumento su adaptación, pasando de tener alta adaptación en el medio M7 a tener alta adaptación en el medio M7 a tener baja adaptación en el medio M8, es decir paso de tener alta adaptación en 2200 ppm de arsenito de sodio a tener baja adaptación en 6000 ppm; entre los 14 y 21 días (7 días de diferencia) no se presentó diferencias en la adaptación. La colonia CAS5 paso de tener alta adaptación a un medio con 2200 ppm de arsenito de sodio a tener baja adaptación a otro medio con 6000 ppm en 11 días de incubación.

Durante todos los periodos de incubación evaluados los microorganismos presentaron un similar comportamiento, pudiendo establecerse según la categoría de adaptación a través del tiempo y según la CIM establecida que la colonia más resistente a altas concentraciones de arsénico bajo los parámetros utilizados fue la colonia CAS3, seguida por la CAS5, luego la colonia CAS1 y finalmente la colonia CAS2.

4.5. IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS ADAPTADAS A AS(III)

Luego de realizar la adaptación de los microorganismos se aisló la colonia en consorcio CAS1, usando medio agar sangre, obteniéndose de estas tres cepas CAS1a, CAS1b, CAS1c

Se identificaron cada una de las cepas aisladas CAS1a, CAS1b, CAS1c, CAS2, CAS3, CAS5 mediante el uso de medios de cultivo, tinciones y pruebas

bioquímicas utilizando el sistema de tablas de identificación. En el anexo 3 se presentan las composiciones de los medios utilizados.

❖ *Tinción de Gram*

Se realizó la tinción de Gram como primer medio de identificación para todas las cepas aisladas, los resultados de la tinción se muestran en la tabla 12, donde se observa que todas las cepas aisladas eran bacilos, las cepas CAs1a, cepa CAs1b, cepa CAs1c y cepa CAs3 fueron bacilos Gram positivos y las cepas CAs2 y cepa CAs5, bacilos Gram negativos.

Tabla 12: Caracterización microscópica de cepas puras.

Cepa	Forma celular	Gram
CAs1a	Bacilos	Positivo
CAs1b	Bacilos	Positivo
CAs1c	Bacilos	Positivo
CAs2	Bacilos	Negativo
CAs3	Bacilos	Positivo
CAs5	Bacilos	Negativo

Asimismo en la figura 13 se muestra las imágenes de las colonias aisladas a 100 X, ya que en la tinción Gram se usó los mismos reactivos, las diferencias entre las coloraciones obtenidas fueron atribuidas a las características específicas en la membrana celular de cada colonia.

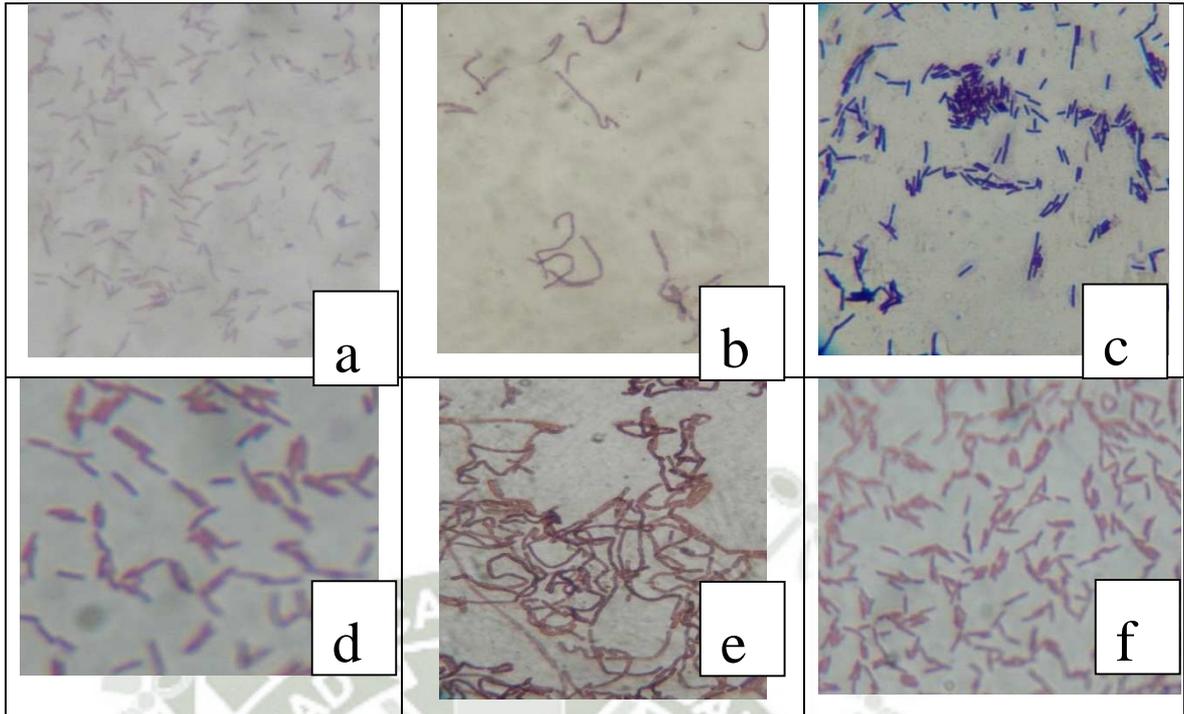


Figura 13: Coloración de GRAM de las cepas nativas aisladas. (a) Cepa CAs1a (b) Cepa CAs1b, (c) Cepa CAs1c, (d) Cepa CAs2, (e) Cepa CAs3, (f) Cepa CAs5.

❖ *Tinción de Wirtz- Conklin*

Se realizó la tinción de espora a todos los microorganismos bacilos Gram positivos observándose que la ubicación de las esporas en las cepas CAs1a, cepa CAs1b, cepa CAs1c y cepa CAs3 fue subterminal- central presentando forma esférica u oval. En la figura 14 se muestra una imagen de la tinción.

Las esporas son la forma de resistencia que las bacterias tienen, son células diferenciadas altamente resistentes al estrés físico y químico, con lo que corroboramos que nuestros microorganismos aislados presentaron resistencia al ambiente extremo del que fueron aislados.

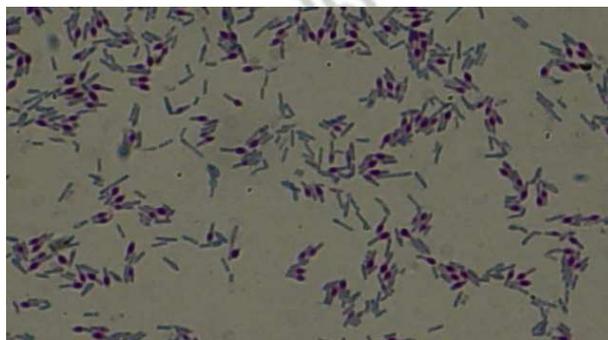


Figura 14: Coloración de Wirtz-Conklin

❖ *Medio Agar Sangre*

Se procedió a sembrar las seis colonias en agar sangre Se realizó un descripción morfológica de cada una de las cepas en base a la forma, bordes, morfología macroscópica de las colonias como se muestra en la tabla 13.

La colonia CAs1a presentó color blanquecino, forma circular y borde redondeado y aspecto mucoide, La colonia CAs1b presentó color blanquecino, forma fusiforme, borde redondeado y aspecto rugoso, La colonia CAs1c fue de color crema, forma circular, borde ondulado y aspecto mucoide; la colonia CAs2 fue de color blanco translúcido, forma irregular, borde lobulado y aspecto plano; la colonia CAs3 fue de color crema, forma redondeada, borde ondulado y aspecto mucoide; la colonia CAs5 fue de color blanco cremoso, forma irregular, borde ondulado y aspecto plano.

Tabla 13: Morfología macroscópica de las cepas puras

Nombre de colonia	Morfología de Colonia ¹			
	Color	Forma	Borde	Aspecto
CAs1a	Blanquecino	Circular	Redondeado	Mucoide
CAs1b	Blanquecino	Fusiforme	Ondulado	Rugoso
CAs1c	Cremosa	Circular	Ondulado	Mucoide
CAs2	blanca traslúcida	Irregular	Lobulado	Plana
CAs3	Crema	Redondeada	Ondulado	Mucoide
CAs5	Blanca cremosa	Irregular	Ondulado	Plana

¹Aquiahuatl Ma.. México: Universidad Autónoma Metropolitana – referencia bibliográfica ⁽⁶³⁾

Adicionalmente se evaluó el tipo de hemólisis, como se presenta en la tabla 14.

Tabla 14: Resultados de la hemólisis ¹

Codificación de la Cepa	Hemólisis
CAs1a	β -hemolítica *
CAs1b	β - hemolítica*
CAs1c	β - hemolítica*
CAs2	β - hemolítica*
CAs3	β - hemolítica*
CAs5	β - hemolítica*

- Hemólisis completa. ¹ Según Madigan MT., Martinko JM., Parker J. Brock Biology of Microorganisms. 10ª ed. España: Pearson Prentice Hall Lippincott; 2004.

Todas las cepas presentaron β -hemólisis, caracterizada por la formación de un halo transparente, lo cual indica una hemólisis completa.⁽³⁷⁾

❖ **Prueba de la Catalasa**

Los resultados mostraron que todas las cepas dieron un resultado positivo para la enzima catalasa como se observa en la tabla 15

Tabla 15: Resultados de la prueba de la catalasa

Cepa	Catalasa
CAs1a	+
CAs1b	+
CAs1c	+
CAs2	+
CAs3	+
CAs5	+

En la figura 15 se observa un resultado positivo, reacción caracterizada por la formación de espuma ⁽⁴⁸⁾



Figura 15: Prueba de la catalasa con resultado positivo

❖ *Prueba de la Oxidasa*

Los microorganismos a los cuales se sometieron a esta prueba fueron: cepa CAs2 y cepa CAs5, tuvieron un resultado positivo lo que indica que presentan la enzima citocromo C oxidasa. La reacción positiva es mostrada por la formación de una coloración purpura ⁽⁴⁸⁾ como se observa en la figura 16.

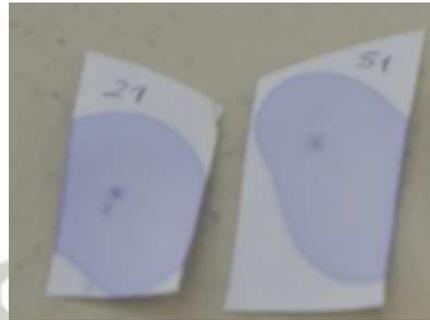


Figura 16: Prueba de la oxidasa positiva

❖ *Prueba de la Ureasa*

A esta prueba, la cepa CAs1a, CAs1c, CAs3, CAs5 dieron resultados negativos y la cepa CAs1b fue positiva, observada a través del viraje de color de amarillo a purpura ⁽⁴⁸⁾, lo que indica que este microorganismo presenta la enzima ureasa, como se observa en la figura 17.

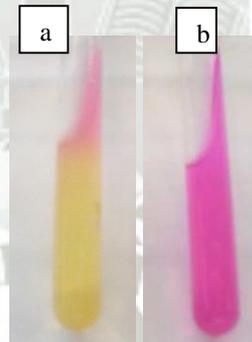


Figura 17: Prueba de la ureasa. (a) resultado negativo, (b) resultado positivo.

❖ *Prueba TSI (Triple Sugar Iron ó Triple Azúcar Hierro)*

La cepa CAs2 y la cepa CAs5 fueron sometidas a esta prueba y los resultados muestran que la primera es K/A -- y la segunda K/K—como se observa en la figura 18. Lo que indica que CAs2 es un microorganismo lactosa -, glucosa +, CO₂ y H₂S negativos y CAs5 se trata de un microorganismo lactosa-, glucosa-, CO₂ y H₂S negativos.

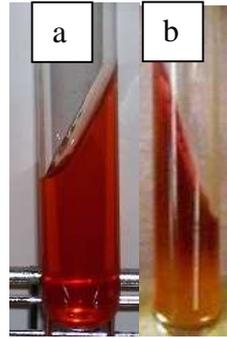


Figura 18: Resultados de la prueba del TSI, (a) K/K--, (b) K/A--.⁽³⁷⁾

❖ **Prueba del O/F (oxidación-fermentación)**

Se realizó esta prueba a las cepas CAs2 y cepa CAs5 obteniendo resultado fermentativo para la primera y oxidativo(O) para la segunda

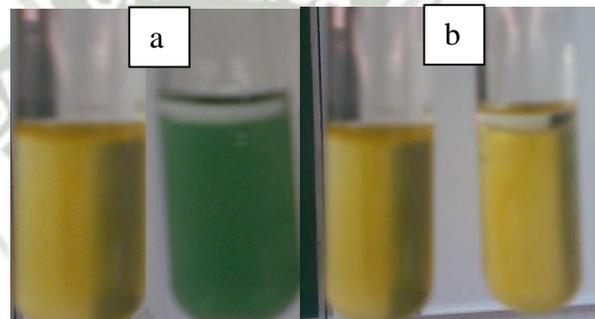


Figura 19: Ilustración de la prueba O/F. (a) oxidativo, (b) fermentativo.

Cuando el tubo abierto es amarillo y el tubo con aceite es verde se interpreta como reacción oxidativa, si la vía es la fermentativa hay un viraje intenso a amarillo que comienza en el fondo de los dos tubos⁽³⁷⁾, como se observa en la figura 19.

❖ **Reducción de nitratos**

Se le realizó la prueba a 5 microorganismos, la cepa CAs1b y la cepa CAs3 dieron resultados negativos a diferencia de la cepa CAs1c cepa CAs1a, cepa CAs5. Dieron resultados positivos es decir que tienen presencia de nitrato reductasa y nitrito reductasa, lo cual se muestra con un viraje a un color rojo intenso por la presencia de nitritos, como se observa en la figura 20.

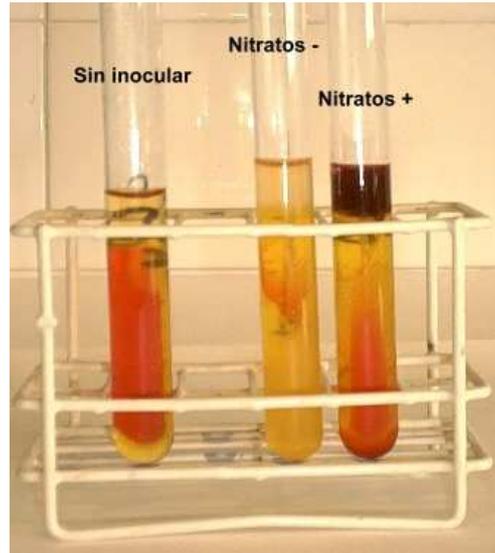


Figura 20: Prueba de reducción de nitratos

❖ *Agar Mcconkey*

Se sembró las cepas CAs2 y la CAs5, obteniéndose crecimiento de colonias incoloras, como se presenta en la figura 21 lo cual indica que se trata de microorganismos como resultado que no son fermentadores de la Lactosa.

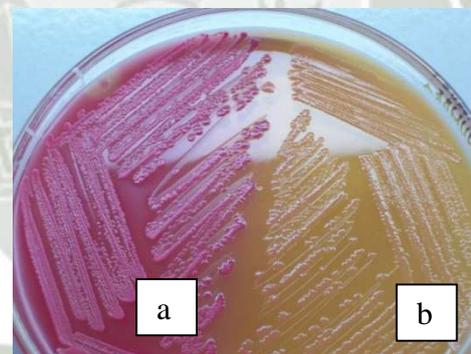


Figura 21: Prueba Mc Conkey. (a) Reacción lactosa +, (b) reacción lactosa negativa.

❖ *Caldo Tioglicolato*

Se observó que las bacterias CAs1a, CAs1b, CAs1c, CAs3 eras estrictamente aerobias ya que crecieron en la parte superior del tubo, mientras que las CAs2 y CAs5 eras facultativas ya que crecían en la totalidad del tubo, no se encontró microorganismos anaerobias estrictas las cuales crecen en las profundidades del medio⁽⁴⁹⁾, como se observa en la figura 22.

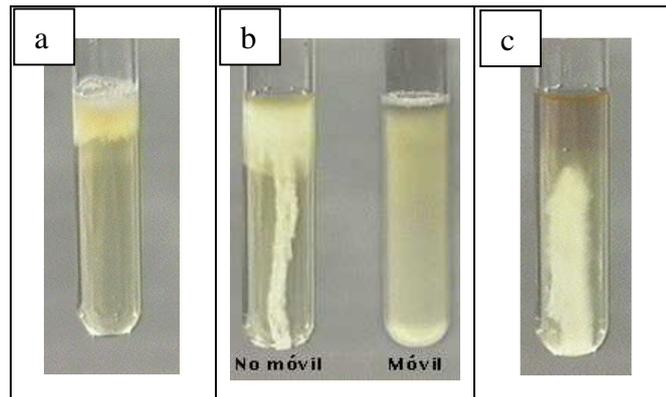


Figura 22: Resultados crecimiento de microorganismos en caldo tioglicolato. (a) Aerobios estrictos solo crecen en la superficie, (b) facultativos crecen en todo el medio, (c) anaerobios estrictos sólo crecen en el fondo

❖ *Prueba Litmus Milk*

Se realizó esta prueba a los bacilos Gram positivos (+), obteniendo resultados positivos para las cepas CAS1a, CAS1c, CAS3, y con resultados negativos cepa CAS1b. como se observa en la figura 23



Figura 23: Resultados para la prueba de leche Litmus

❖ *Medio gelatina Nutritiva*

Se observó resultados positivos en la cepa CAS1a, cepa CAS1c, cepa CAS3 lo que demuestra la hidrólisis de la molécula proteica por acción de la gelatinasa. Asimismo las cepas CAS1b y CAS5, no presentaron licuefacción, lo cual indica una reacción negativa como se observa en la figura 24.



Figura 24: Resultados de prueba gelatina. (Arriba) gelatinasa positiva, (abajo) gelatinasa negativa.

❖ *Prueba de Motilidad*

Se observó motilidad positiva en las cepas CAs1a, cepa CAs1b, cepa CAs1c, cepa CAs3, cepa CAs2 y el único que presentó resultado negativo fue la cepa CAs5; la motilidad fue observada a través de un microscopio donde se vio bacterias muy pequeñas y casi translúcidas moviéndose, en la figura 25 se presenta la prueba.



Figura 25: Prueba de motilidad por gota invertida

❖ *Prueba de indol*

En la cepa CAs2 se observó resultado positivo, evidenciado por una coloración roja en la superficie del tubo, y un resultado negativo en las cepas CAs1a, CAs1b, CAs1c, CAs3, y CAs5, observándose la presencia de un color amarillento, como se observa en la figura 26.

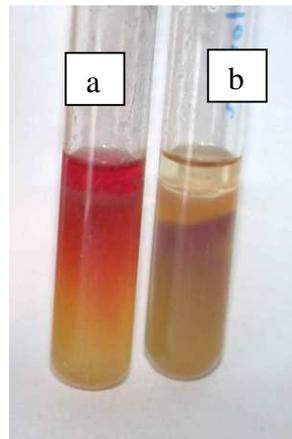


Figura 26: Prueba Indol.(a) indol positivo, (b) indol negativo

❖ **Medio Manitol Salado**

Las bacterias que crecen en un medio con alta concentración de sal y fermentan el manitol, producen ácidos, con lo que se modifica el pH del medio y vira el indicador de pH del color rojo al amarillo. ⁽³⁷⁾ Se obtuvo resultados positivos para la cepa CAs1a, y resultados negativos a las cepas CAs1b y CAs1c, como se observa en la figura 27.

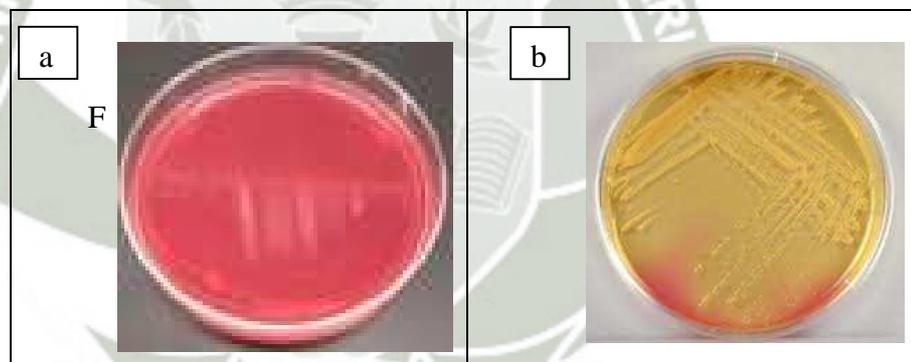


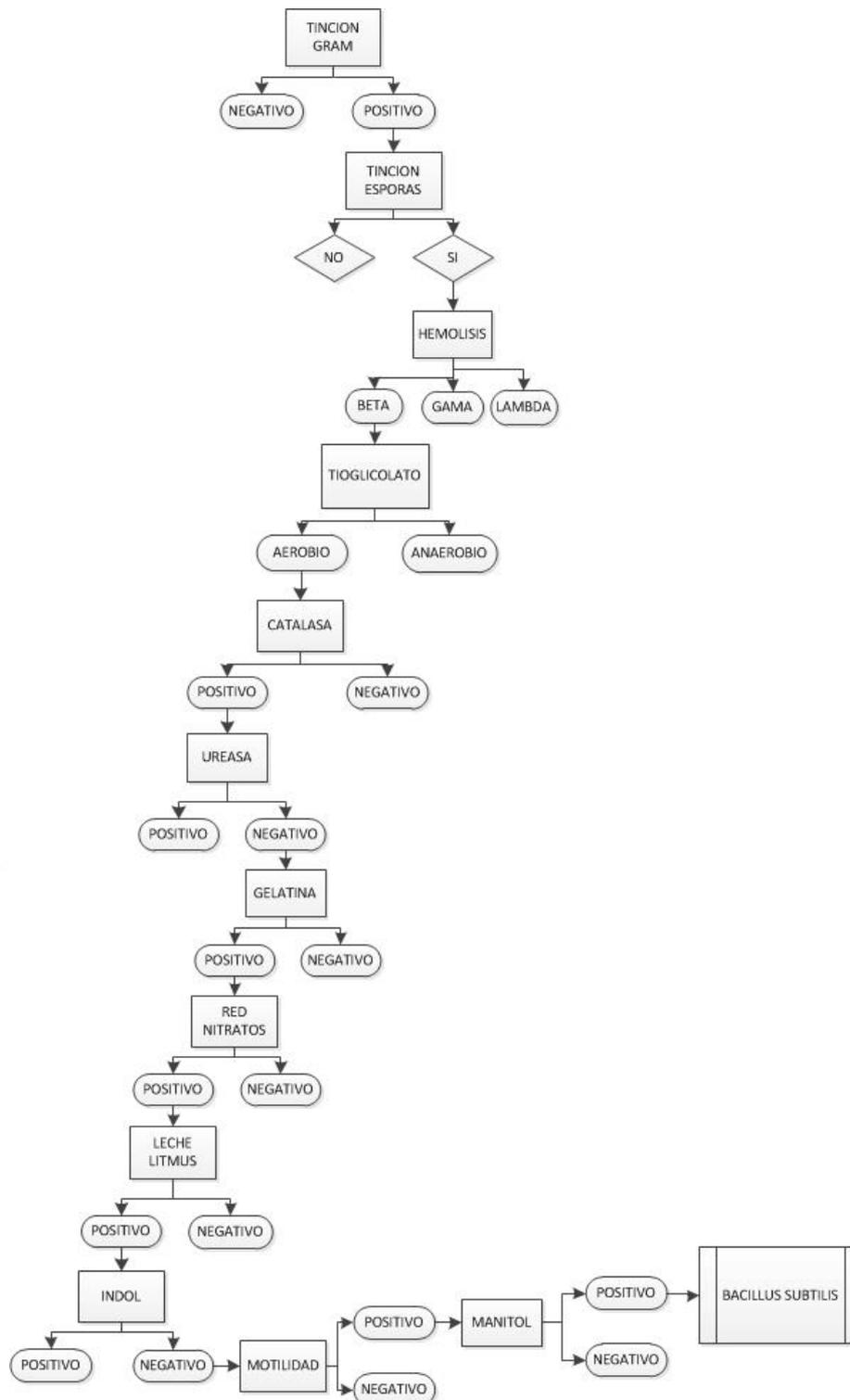
Figura 27: Resultados Manitol Salado. (a) Negativo, (b) Positivo

4.6. RESUMEN DE LA IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS AISLADAS

❖ *Cepa CAs1a*

Se inició la identificación de esta cepa sembrada en agar sangre de acuerdo a su morfología macroscópica color blanquecino, forma circular, bordes redondeados y de aspecto mucoso de acuerdo a estas características se procedió hacer las tinciones correspondientes, la tinción de GRAM dio bacilos Gram positivos, con la tinción Wirtz Conklin se pudo identificar la presencia de esporas con una ubicación subterminal-central, por los resultados obtenidos tenemos una tentativa de estar en presencia del género *Bacillus spp.* Con las pruebas bioquímicas podremos afirmar el género y llegar a una posible identificación de especie, al realizar las pruebas bioquímicas se obtuvo que en la prueba de tioglicolato se observó una respiración aerobia, la prueba de catalasa dio positivo lo cual demostraría la presencia de la enzima catalasa descartándose *Bacillus Amyloliquefaciens, Bacillus Firmus, Bacillus Circulans, Bacillus Coagulans, Bacillus Brevis*, la prueba de la ureasa con resultado negativo y la prueba de gelatina positivo descartamos a la especie *Bacillus Lentus*, red de nitratos con resultados positivos descartamos la especie *Bacillus Megaterium*, las pruebas leche litmus y motilidad dieron positivo, la prueba de indol fue negativa dando como resultado que las posibles especies *Bacillus.cereus* y *Bacillus subtilis* por la siembra en manitol salado con resultado positivo logro descartar *Bacillus cereus* y se logró identificar la especie *Bacillus Subtilis* ⁽⁶⁴⁾, como se muestra en el Flujograma N° 1.

Flujograma N° 1:

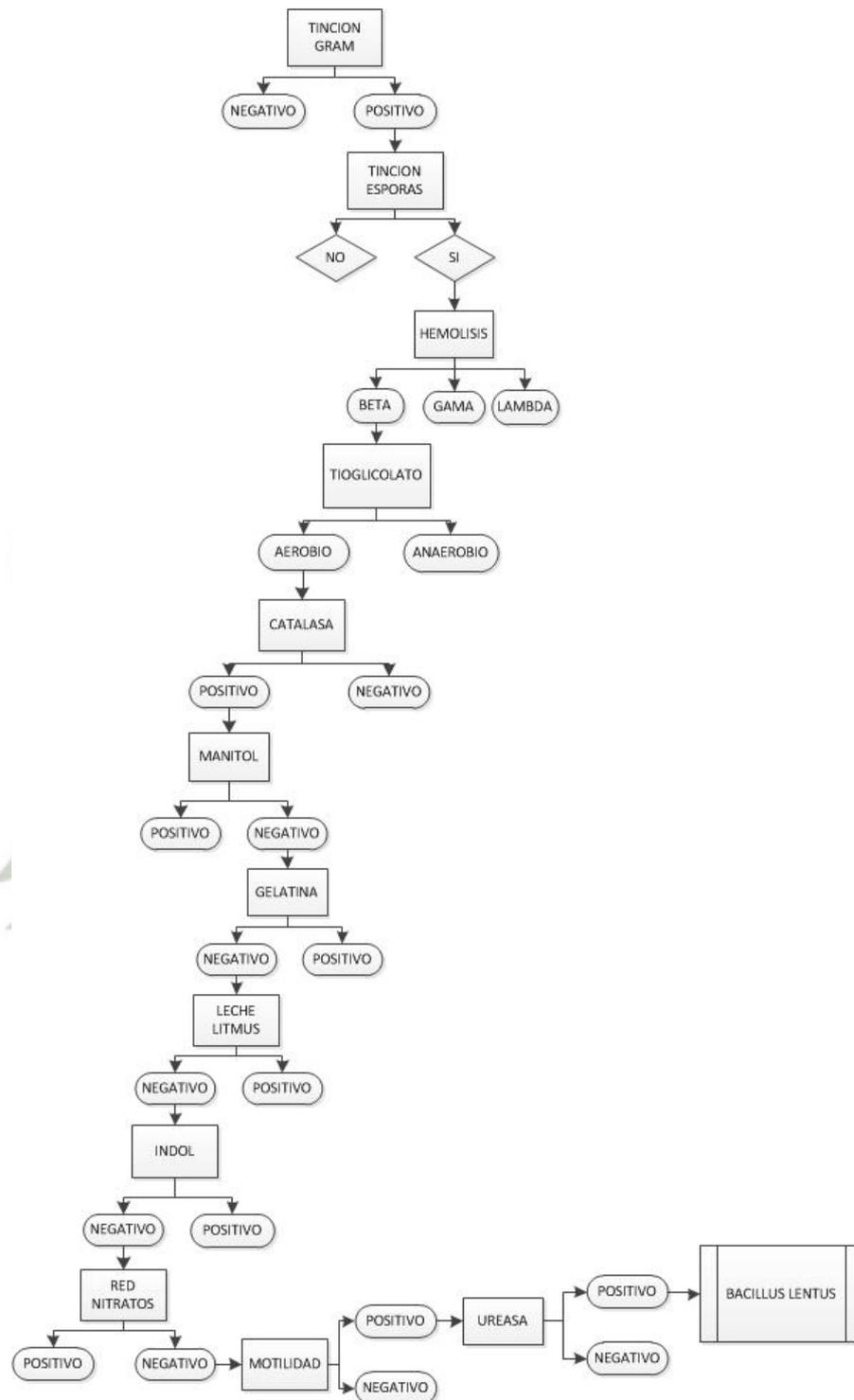


Fuente: Koneman y col., 2001 ⁽⁶⁵⁾

❖ *Cepa CAs1b*

Se inició la identificación de esta cepa sembrada en agar sangre de acuerdo a su morfología macroscópica color blanquecino, forma fusiforme, bordes ondulados y de aspecto mucoso de acuerdo a estas características se procedió hacer las tinciones correspondientes, la tinción de GRAM dio bacilos Gram positivos, con la tinción Wirtz Conklin se pudo identificar la presencia de esporas con una ubicación subterminal-central, por los resultados obtenidos tenemos una tentativa de estar en presencia del género *Bacillus* spp. Con las pruebas bioquímicas podremos afirmar el género y llegar a una posible identificación de especie, al realizar las pruebas bioquímicas se obtuvo que en la prueba de tioglicolato se observó una respiración aerobia, la prueba de catalasa dio positivo lo cual demostraría la presencia de la enzima catalasa descartándose *Bacillus Amylolyquefaciens*, *Bacillus Firmus*, *Bacillus Circulans*, *Bacillus Coagulans*, *Bacillus Brevis*, las pruebas de la ureasa y la motilidad con resultados positivos y las pruebas de gelatina, red de nitratos y leche litmus, prueba de indol con resultados negativos, descartando *Bacillus Cereus*, *Bacillus Subtilis*, y por la siembra en manitol salado con resultado negativo se logró identificar la especie *Bacillus Lentus* ⁽⁶⁴⁾, como se muestra en el Flujoograma N° 2.

Flujograma N°2:

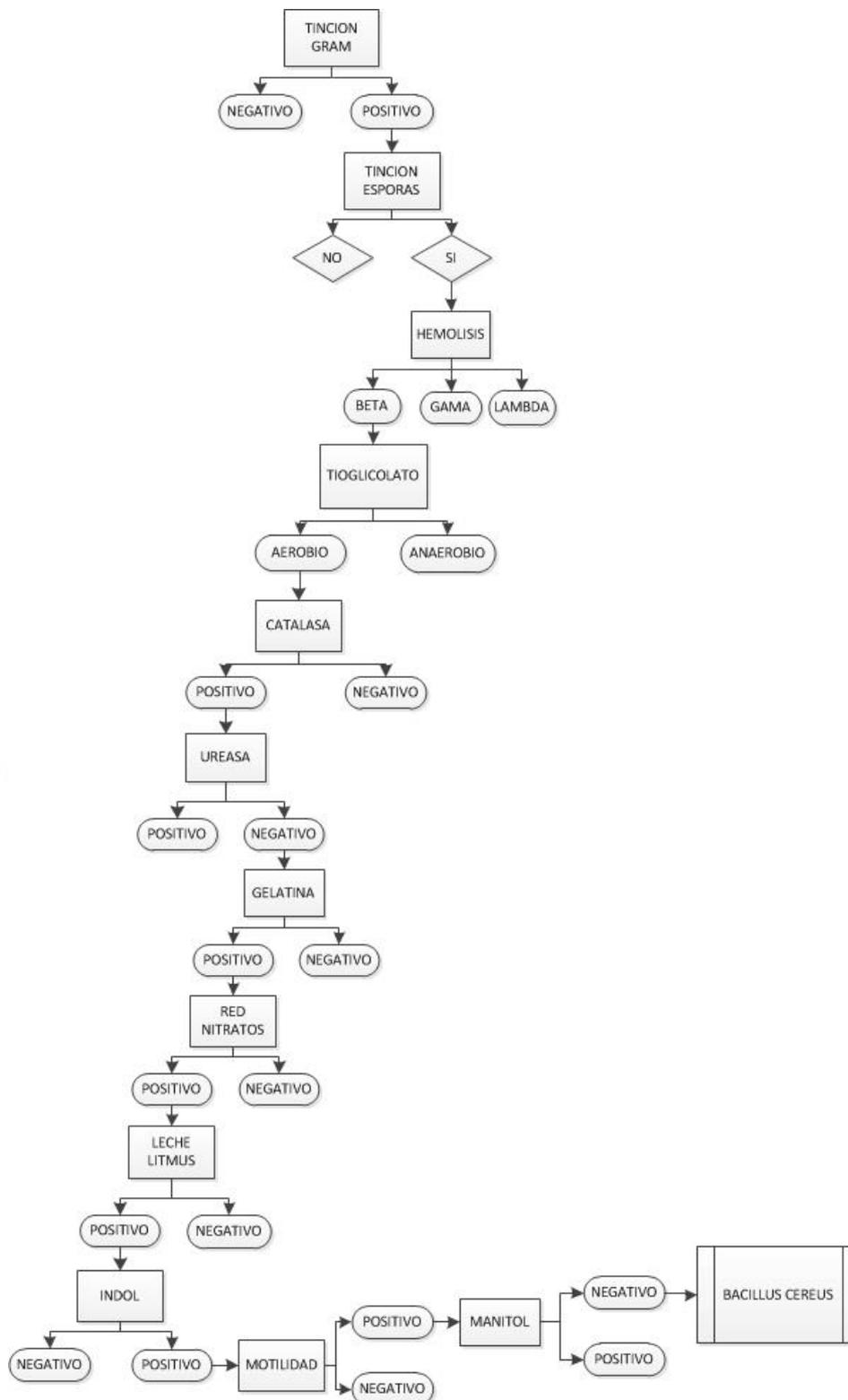


Fuente: Koneman y col., 2001 ⁽⁶⁵⁾

❖ *Cepa CAs1c*

Se inició la identificación de esta cepa sembrada en agar sangre de acuerdo a su morfología macroscópica color cremoso, forma circular, bordes ondulados y de aspecto mucoso de acuerdo a estas características se procedió hacer las tinciones correspondientes, la tinción de GRAM dio bacilos Gram positivos, con la tinción Wirtz Conklin se pudo identificar la presencia de esporas con una ubicación subterminal-central, por los resultados obtenidos tenemos una tentativa de estar en presencia del género *Bacillus spp.* Con las pruebas bioquímicas podremos afirmar el género y llegar a una posible identificación de especie, al realizar las pruebas bioquímicas se obtuvo que en las prueba de tioglicolato se observó una respiración aerobia, la prueba de catalasa dio positivo lo cual demostraría la presencia de la enzima catalasa descartándose *Bacillus Amyloliquefaciens*, *Bacillus Firmus*, *Bacillus Circulans*, *Bacillus Brevis*, *Bacillus Coagulans*, la prueba de la ureasa con resultado negativo y la prueba de gelatina positivo descartamos a la especie *Bacillus Lentus*, red de nitratos con resultados positivos descartamos la especie *Bacillus Megaterium*, las pruebas leche litmus y motilidad dieron positivo, la prueba de indol fue negativa dando como resultado que las posibles especies *Bacillus Cereus* y *Bacillus Subtilis* por la siembra en manitol salado con resultado negativo logro descartar *Bacillus Subtilis* y se logró identificar la especie *Bacillus Cereus* ⁽⁶⁴⁾, como se muestra en el Flujoograma N°3.

Flujograma N°3

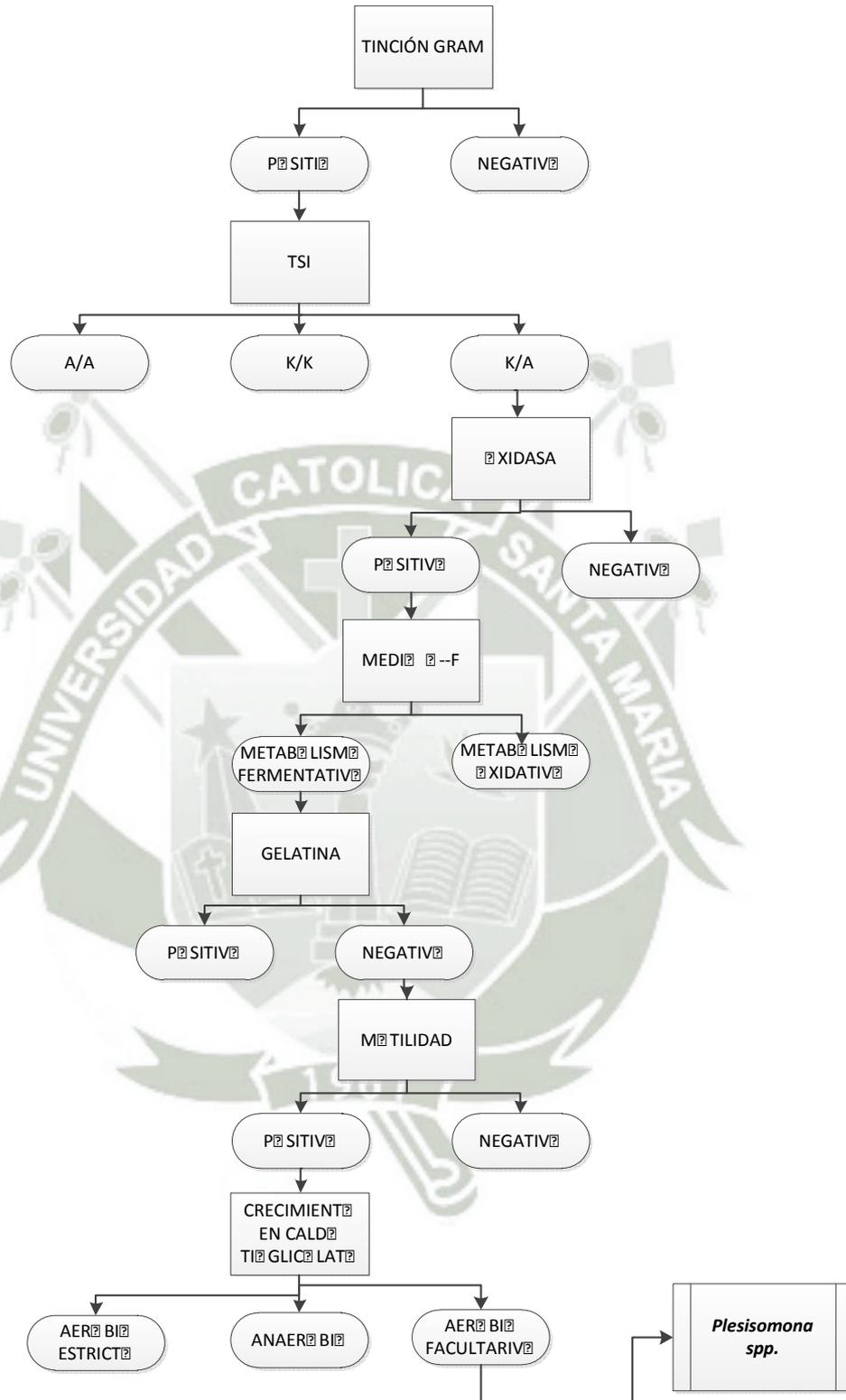


Fuente: Koneman y col., 2001⁽⁶⁵⁾

❖ *Cepa CAs2*

Las colonias obtenidas en agar sangre fueron de color blanco translucido, de forma irregular bordes lobulados y con aspecto plano; de acuerdo tinción GRAM se obtuvieron bacilos Gram negativos, se utilizó el Flujograma N° 4 para la identificación de esta cepa. Se inició la identificación con la prueba TSI la cual dio K/A lo cual indica que fermenta glucosa, además la prueba O-F dio como resultado que se trataba de un microorganismo de metabolismo fermentativo, pudiendo ser de la familia de las enterobacterias o de las familias *Vibrio*, *Pleisomona*, *Aeromona*; se realizó la prueba de citocromo oxidasa, obteniendo un resultado positivo con lo que se eliminó a las familia de enterobacterias, la prueba de licuefacción de gelatina negativa descarta a los géneros *Vibrio* y *Aeromonas*; además el crecimiento en caldo tioglicolato muestra que se trata de un microorganismo aerobio facultativo y la prueba de motilidad positiva confirman que Cepa 2 corresponde al género *Pleisomona spp.*⁽⁴⁵⁾

Flujograma N°4

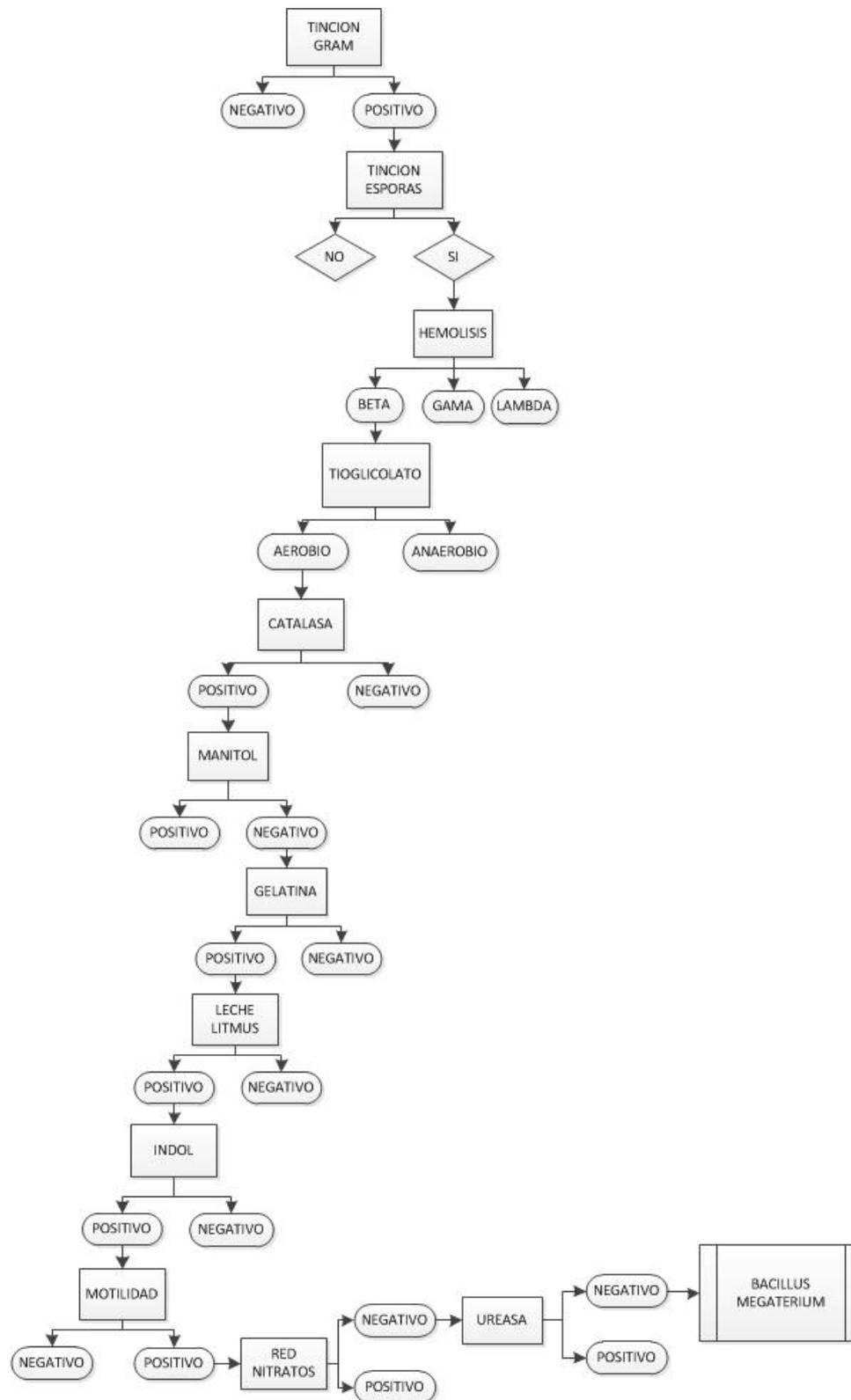


Fuente: Jave, J.M.(2008) Guía de Microbiología ⁽⁴⁵⁾

❖ *Cepa CAs3*

Se inició la identificación de esta cepa sembrada en agar sangre de acuerdo a su morfología macroscópica color cremoso, forma circular, bordes ondulados y de aspecto mucoso de acuerdo a estas características se procedió hacer las tinciones correspondientes, la tinción de GRAM dio bacilos Gram positivos, con la tinción Wirtz Conklin se pudo identificar la presencia de esporas con una ubicación subterminal-central, por los resultados obtenidos tenemos una tentativa de estar en presencia del género *Bacillus spp.* Con las pruebas bioquímicas podremos afirmar el género y llegar a una posible identificación de especie, al realizar las pruebas bioquímicas se obtuvo que en las prueba de tioglicolato se observó una respiración aerobia, la prueba de catalasa dio positivo lo cual demostraría la presencia de la enzima catalasa descartándose *Bacillus Amyloliquefaciens*, *Bacillus Firmus*, *Bacillus Circulans*, *Bacillus Brevis*, *Bacillus Coagulans*, la prueba de la ureasa con resultado negativo y la prueba de gelatina positivo descartamos a la especie *Bacillus Lentus*, red de nitratos con resultados negativos descartamos la especie *Bacillus Cereus*, *Bacillus Subtilis*, las pruebas leche litmus y motilidad dieron positivo, la prueba de indol por la siembra en manitol salado con resultados negativos dando como resultado que las posibles especies *Bacillus pumilis*, *Bacillus Firmus* y *Bacillus Megaterium* y se logró identificar la especie *Bacillus Megaterium*⁽⁶⁴⁾, como se muestra en el Flujoograma N° 5.

Flujograma N°5

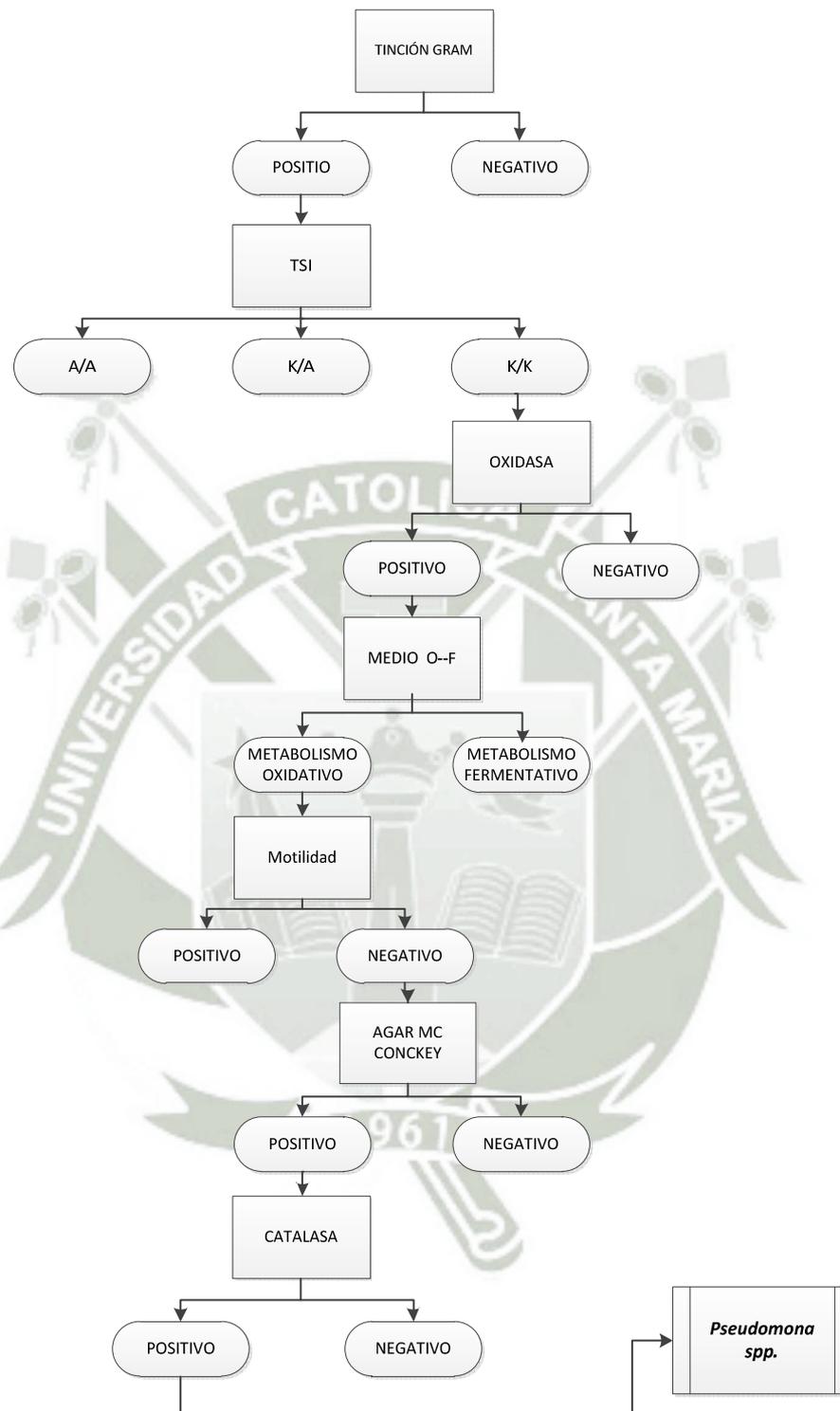


Fuente: Koneman y col., 2001⁽⁶⁵⁾

❖ *Cepa CAs5*

Las colonias obtenidas en agar sangre fueron de color blanco cremoso, de forma irregular bordes ondulados con aspecto plano; de acuerdo tinción GRAM se obtuvieron bacilos Gram negativos, se utilizó el Flujograma N° 6 para la identificación de esta cepa. Se inició la identificación con la prueba TSI la cual dio K/K lo cual indica que no fermenta glucosa ni lactosa y que es un microorganismo NO FERMENTADOR, los bacilos Gram negativos no fermentadores representan 7 generos : *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flabobacterium*, *Bordetela*, *Moraxela* , *Xantomonas*, *Alcaligenes*. La prueba de O-F indicó que se trataba de un microorganismo de metabolismo oxidativo, los 7 géneros antes mencionados tienen esta característica, se descartó a los géneros *Acinetobacter* y *Moraxela* ya que no presentan motilidad, también se descartó a los géneros *Alcaligenes*, *Xantomonas* y *Flavobacterium* ya que no presentaron crecimiento en agar Mc Conkey o presentaron crecimiento pobre. La prueba de la oxidasa dio positiva, concluyendo que el microorganismo aislado corresponde al género *Pseudomona spp.*

Flujograma N°6



Fuente: Jave, J.M.(2008) Guía de Microbiología ⁽⁴⁵⁾

A continuación presentamos una en la tabla 16 y 17 resumen de las pruebas que permitieron encontrar los resultados y las cepas identificadas

Tabla 16: Resumen de las principales pruebas bioquímicas para la identificación de las especies microbiológicas gram positivas

Código	Morfología	Gram	Esporas	Hemolisis	Catalasa	Respiración	Ureasa	Gelatina	Red nitratos	Leche Hímus	Indol	Motilidad	Mantol	Microrganismos
CAs1a	Bacilos	Positivo	ST/C*	b. hemolisis	positivo	aerobia	Negativo	positivo	Positivo	positivo	negativo	positivo	positivo	<i>BACILLUS SUBTILIS</i>
CAs1b	Bacilos	Positivo	ST/C*	b. hemolisis	positivo	aerobia	Positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo	negativo	<i>BACILLUS LENTUS</i>
CAs1c	Bacilos	Positivo	ST/C*	b. hemolisis	positivo	Aerobia	Negativo	positivo	Positivo	positivo	negativo	positivo	negativo	<i>BACILLUS CEREUS</i>
Cepa 3	Bacilo	Positivo	ST/C*	b. hemolisis	positivo	Aerobia	Negativo	positivo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo	<i>BACILLUS MEGATERIU M</i>

* ST/C: Subterminal-central

Tabla 17: Resumen de las principales pruebas bioquímicas para la identificación de las especies gram negativas

Código	Morfología	Gram	Mc Conkey	Respiración	Oxidasa	Of	TSI*	Gelatina	Catalasa	Motilidad	Microorganismos
CAs2	Bacilos	Negativo	Crece	Aerobio facultativo	Positivo	fermentativo	K/A—	negativa	Positivo	Positiva	PLEISOMONA SPP.
CAs5	Bacilos	Negativo	Crece	Aerobio facultativo	Positivo	Oxidativo	K/K—	negativa	Positivo	Negativa	PSEUDOMONA SPP.

*K/A : Alcalino /Acido , negativo para la formación de CO₂ y H₂S

,K/K: Alcalino/Alcalino, negativo para la formación de CO₂ y H₂S

Bacillus y Pseudomona son 2 grupos de bacterias conocidos por su resistencia al arsénico. ^(66, 67,24). A nivel mundial se han llevado a cabo varios estudios para el aislamiento de bacterias resistentes a arsénico de estuarios, aguas subterráneas, agua de mar, aguas residuales, suelos. Hasta ahora todos los estudios indican que las bacterias con resistencia a arsénico y también las bacterias transformadoras están ampliamente distribuidas y son filogenéticamente diversas.

El Género Pseudomonas comprende bacterias ubicuas dotadas con una capacidad de adaptación extraordinaria a florecer en diversos ambientes. La Pseudomona es representada ampliamente por cepas bacterianas arsénico-resistentes aisladas de sitios contaminados ^(68, 72, 69). Asimismo estudios previos muestras que muchas bacterias del género Bacillus fueron reportadas con resistencia al arsénico ^(70, 24,71).

Varias especies aisladas de diferentes sitios pueden tener el potencial para tratar la contaminación por arsénico. En general, por las características de las cepas, estas son capaces de crecer tanto en condiciones aeróbicas y anaeróbicas, condiciones similares a las de los sitios ambientales, y tiene alta tolerancia, lo que es fundamental para la tecnología de biodepuración y depende en gran medida de la actividad de las bacterias nativas en los sitios contaminados.

4.7. OBTENCIÓN DE LA MUESTRA PROVENIENTE A LA PUNTA DE BOMBÓN (MP)

La segunda toma de muestra se realizó en el distrito de Punta de Bombón, provincia de Islay, departamento de Arequipa, y corresponde a un pozo de captación para potabilización de agua, ubicado geográficamente a una latitud sur de $17^{\circ}10'5.52''$, y longitud oeste de $71^{\circ}47'35.89''$ O a 24 m.s.n.m.; esta muestra (MP) fue utilizada para la prueba del Sistema.

El agua subterránea representa una fracción importante de la masa de agua presente, y se aloja en los acuíferos bajo la superficie de la Tierra. ⁽⁷³⁾ El sistema de captación utilizado por la empresa prestadora de servicios SEDAPAR

SA. es el bombeo, su disponibilidad en el propio lugar donde se genera la demanda hace que el costo de los sistemas de abastecimiento relacionados a la conducción sea moderado, informes del análisis de arsénico hechos anteriormente en esta zona por el departamento de control de calidad de la empresa prestadora de servicios SEDAPAR SA, muestran que la fuente de agua utilizada presenta niveles de arsénico superiores a los niveles sugeridos como límites para el consumo humano ⁽¹⁴⁾, fue por eso que se decidió tomar muestra y someterla al tratamiento..

En la figura N° 28 se muestra el pozo que administra SEDAPAR, empresa de servicio de agua potable y alcantarillado, este pozo provee agua para el distrito de Punta de Bombón.



1: Punto de muestreo

Figura 28: Punto de muestreo del pozo de Punta de Bombón

❖ *Transporte*

La muestra estuvo protegida y sellada herméticamente de tal forma que no se deteriore y que no se pierda nada de su contenido durante el transporte. El embalado protegió al recipiente de una posible contaminación externa, la muestra se mantuvo fresca y protegida de la luz, no se añadió conservantes, la muestra fue analizada a las 10 horas de haber hecho el muestreo, fue transportada en un cooler como se muestra en la figura 29.



Figura 29: Transporte de muestra del pozo de Punta de Bombón

❖ **Almacenamiento**

La muestra proveniente de la punta de bombón (MP) para la caracterización fisicoquímica se almacenó en un refrigerador de -20°C permitiendo un periodo de almacenamiento largo, como se observa en la figura 30.



Figura 30: Refrigerador para el almacenamiento de muestras

4.8. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE AGUAS CRUDAS DE LA MUESTRA DE AGUAS SUBTERRANEAS DE PUNTA DE BOMBON (MP)

En la tabla 18 se muestra el resultado del análisis de arsénico por triplicado MP1, MP2, M3 correspondientes a la muestra (MP) antes de entrar al sistema, , debido a que se le añadió 1ppm de arsenito de sodio a la muestra (MP) para potenciar la acción del consorcio bacteriano sobre el arsénico, se corrigió los valores del triplicado , reduciendo 1 ppm a los valores obtenidos , de esta manera el promedio de arsénico en el agua subterránea fue de 0,070 ppm.

Tabla 18: Concentración de arsénico inicial corregida de la muestra (MP).

	Muestra MP1*	Muestra MP2*	Muestra MP3*
Concentración de Arsénico Total ¹, ppm	0,08	0,077	0,053
Promedio ,ppm			0,070

1: correspondiente al tiempo 0 (antes de ser realizado el tratamiento) y - restándole 1 ppm de arsenito de sodio añadido.

•MP1, MP2 y MP3 corresponden a la muestra MP analizada por triplicado.

Los parámetros pH, Conductividad y STD se encontraron inicialmente dentro de los límites máximos permisibles a diferencia de los cloruros, sulfatos y dureza total se encontraban sobre el límite máximo permisible para el consumo humano. Como se observa en la tabla 19.

Las aguas con elevados niveles de sulfato de magnesio o sulfato de sodio, pueden tener efecto laxante; los sulfatos también pueden darle un sabor amargo y en condiciones anaeróbicas le dan un olor nauseabundo, los sulfatos también producen una dureza permanente al agua al combinarse con el calcio; altas concentraciones de cloruros comunican al agua sabor salobre y los cloruros también comunican dureza al agua⁽¹⁶⁾; La turbiedad es la expresión de la propiedad óptica que tiene una sustancia líquida de dispersar y absorber sin cambio de dirección la luz que pasa a través de ella, la turbidez es causada por material suspendido, arcilla, material orgánico e inorgánico, plancton y

microorganismos ⁽⁷⁴⁾ , los resultados obtenidos explican la baja calidad del agua destinada para consumo humano en el distrito de Punta de Bombón.

Tabla 19: Calidad fisicoquímica del agua de Punta de Bombón antes del tratamiento.

	Antes del tratamiento	LMP*
pH, unidad de pH	7,38	6,5 -8,5
Temperatura, °C	11,46	-
Conductividad, µS/cm	1226	1500
STD, mg/L	613	1000
% Sal	0,61	-
OD, mg/L	3,0	-
Turbiedad ,UNT	110	5
Cloruros, mg/L	650,25	250
Sulfatos, mg/L	616,74	250
Dureza total mg/L CaCO ₃	695,38	500

*Según el Anexo N° 1

Los centros poblados más importantes que usan el agua de la cuenca del río tambo para consumo humano son Mollendo y Punta de Bombón que se concentran en la provincia de Islay en el departamento de Arequipa. El consumo per-cápita estimado para las poblaciones urbana y rural son de 607 y 425 L/hab/día, respectivamente. ⁽⁷⁵⁾

Existen limitaciones para el uso doméstico ya que las aguas del río tambo deberían ser consideradas como buena calidad pero la presencia de sustancias tóxicas degradan dicha clasificación. Los elementos encontrados nocivos son el cadmio, arsénico y plomo, seguidos en importancia de afectación por el cromo y el níquel, los cuales están presentes en concentraciones nocivas en la mayoría de los casos. ⁽⁷⁵⁾

Existe una clara tendencia de que a mayores concentraciones de As en el agua subterránea se observan mayores casos de muertes por cáncer cuando la

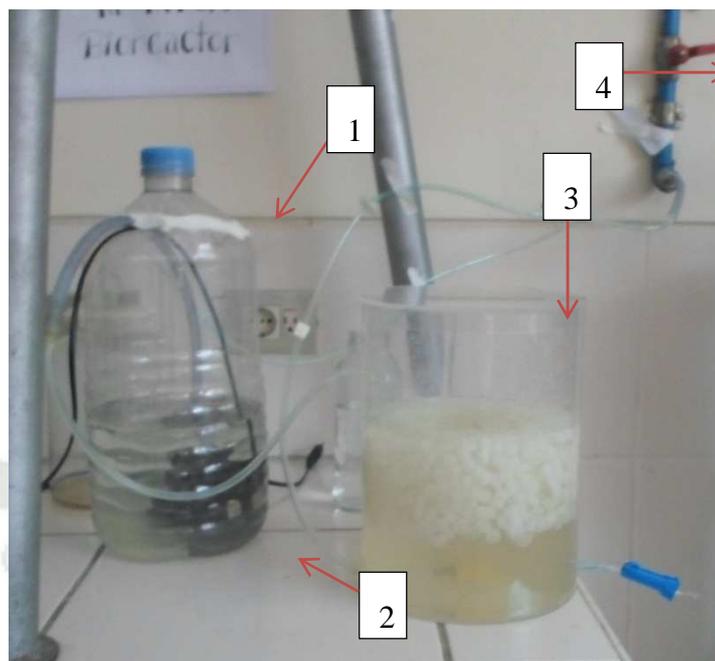
misma es utilizada como agua de bebida. La concentración máxima permisible recientemente adoptada son de 0,01 mg/l resulta en un nivel altamente exigente.

Con este nuevo límite la gran mayoría de los sistemas acuíferos no podrían ser aprovechados para el consumo, sin previos tratamientos o adopción de nuevos sistemas de remediación para las aguas arsenicales. Por otro lado, debería destacarse que los límites aplicables para el agua de consumo deberían ser particulares de cada región, relacionados con sus condiciones climatológicas, sanitarias y nutricionales, entre otras. ⁽¹⁶⁾

4.9. DISEÑO DEL SISTEMA MBBR PARA REDUCCIÓN DE CONCENTRACIÓN DE ARSENICO EN AGUA

Los reactores de lecho móvil disponen de una fuente de aireación cubriendo toda la superficie del fondo de los reactores con el fin de garantizar el aporte de oxígeno necesario para el tratamiento, así como asegurar una correcta agitación del agua y el soporte plástico. Este sistema de aireación, combinado con la presencia de soporte plástico, presenta una buena transferencia de oxígeno a fin de cubrir las necesidades del sistema. ⁽³²⁾

El sistema MBBR es hoy usado para muchos propósito: para el tratamiento de aguas residuales municipales e industriales, para a remoción de materia orgánica, para nitrificación y denitrificación. Es particularmente favorable donde el espacio es limitado o para la ampliación de antiguas plantas de tratamiento. La tecnología ha sido también usada para retirar color en tratamientos de agua potable y para remoción de fosforo biológico y agua residual. ⁽⁷⁶⁾ Dado ellos se decidió innovar, probando el comportamiento de este sistema en la reducción de arsénico en agua para consumo humano



1: tanque de almacén de agua.2: Bomba dosificadora.3: reactor MBBR.4: Tanque presurizado ⁽³¹⁾

Figura 31: Sistema configurado para la reducción de la concentración de arsénico en agua.

El sistema fue configurado de acuerdo a las especificaciones del método correspondiente y fue puesto en marcha, en la figura 31 se observa el sistema configurado, con sus cuatro principales componentes, un tanque de almacenamiento, el cual tuvo una capacidad de 7 litros; una bomba centrífuga con las siguientes características (Flujo de 150-350 l/h ; Dimensiones 9 x 7,5 x 6,5 cm. ; Potencia: 5 Watios); el tercer componente fue el reactor MBBR, que contenía una biopelícula de microorganismos resistentes a altas concentraciones de arsénico adherida a de soportes de polietileno de alta densidad (PEHD) previamente tratados. el cuarto componente fue el tanque presurizado, el cual constituyó la fuente de aire comprimido

La biopelícula estuvo conformada por el consorcio de microorganismos *Bacillus Subtilis*, *Bacillus Lentus*, *Bacillus Cereus*, *Pleisomona spp*, *Bacillus megaterium*, y *Pseudomona spp*.

Se incorporó mangueras de plástico esterilizadas, para conectar los subsistemas, un dosificador en la salida para la realización de la toma de muestras y un filtro para la entrada de aire.

4.10. EVALUACION DEL SISTEMA

Se midió la concentración de arsénico (ppm) de la muestra inicial (tiempo 0) y a las 5, 10, 24 horas de tiempo de retención, se realizó el muestreo por triplicado. Los resultados obtenidos de las pruebas de espectroscopia atómica ICP se muestran en la Tabla 20, donde se observa que al aumentar el tiempo de retención las concentraciones de arsénico presentes en el agua disminuían.

Tabla 20: Concentración de arsénico en agua a diferentes tiempos de retención

Concentración de Arsénico Total	Tiempo , horas			
	0	5	10	24
Muestra 1, ppm	1,080	0,984	0,956	0,933
Muestra 2, ppm	1,077	0,975	0,957	0,960
Muestra 3,ppm	1,053	0,983	0,961	0,800
Promedio	1,070	0,981	0,958	0,898

- El tiempo 0 corresponde a la concentración real del arsénico en agua subterránea con 1mg/L de arsenito de sodio añadido.

La prueba de ANOVA de un factor, fue utilizada para ver si la diferencia en la reducción de arsénico a las 0, 5,10, 24 horas de tratamiento era significativa

Como se presenta en la tabla 29 (anexo 6) de la prueba de ANOVA, el estadístico F fue 8,075 con una significancia de 0,008, dado que $P < 0,05$; se rechazó la H_0 , la cual indica las medias de concentración de arsénico para cada tiempo de retención son iguales; y se aceptó la H_1 , indicando que al menos dos medias obtenidas para cada tiempo de retención son distintas.

La distribución de los resultados para el 0, 5, 10,24 horas de retención de arsénico se presenta gráficamente mediante un diagrama de caja – bigote (BOX and Whisker ó Box Plot) como se observa en la gráfica 7 (anexo 5).

En la tabla 30(anexo 6) se observa la comparación múltiple para la prueba de ANOVA, la cual determina que las medias para los tiempos de retención 0 y 24 horas, presentaron diferencia significativa (Sig. = 0,006).

Se determinó que sí existe diferencia significativa entre los datos obtenidos por lo que se procedió a realizar la prueba de HDS Tukey, para agrupar las muestras según su diferencia, como se muestra en la tabla 31, (anexo 6) en donde se aprecia los dos subconjuntos el primero (concentración de arsénico a las 0, 5 y 10 horas de retención), y segundo (concentración de arsénico a las 5, 10 y 24 horas de retención).

Tabla 21: Arsénico reducido del agua por tiempos de retención

Tiempo de retención, horas	Concentración de Arsénico reducido, ppm	Porcentaje de reducción, %
0	0	0
5	0,089	8,32
10	0,112	10,47
24	0,172	16,08

En 24 horas de tratamiento con el sistema MBBR implementado se redujo 0,172 ppm de arsénico, a las 10 horas 0,112 ppm, a las 5 horas , 0,089 ; el porcentaje de reducción a las 24 horas fue 16,08%, a las 10 horas 10,4%, y a las 5 horas 8,32%; como se muestra en la Tabla 21.

Con el promedio de concentración de arsénico de cada tiempo de retención, se generó una curva de reducción, la cual es mostrada en la figura 32, en la que se observa la reducción de la concentración de arsénico a medida que se prolonga el tiempo de tratamiento.

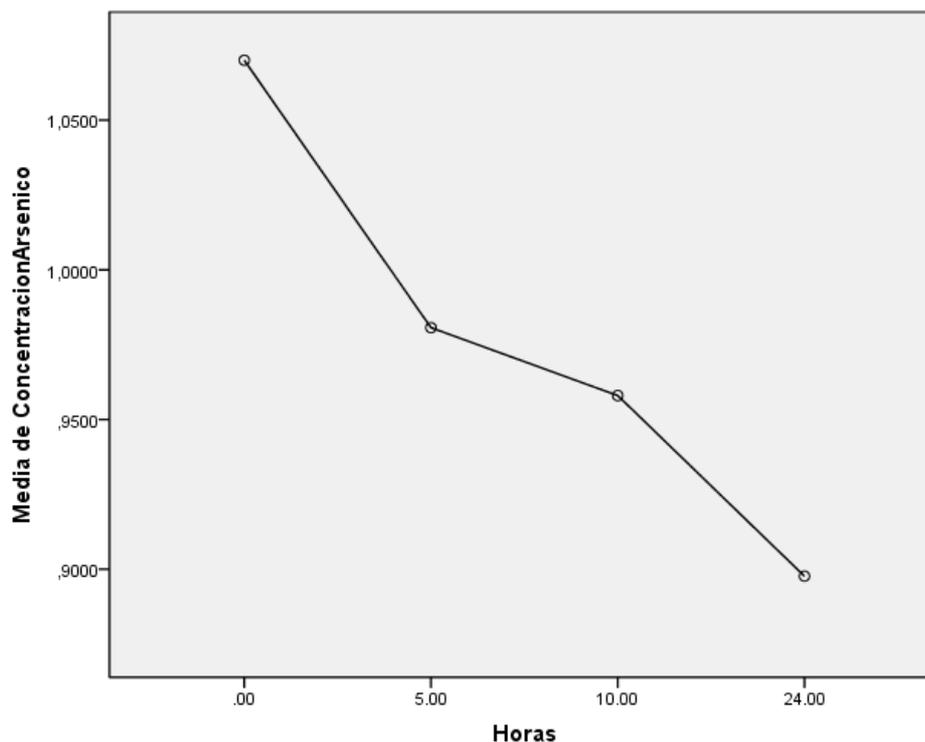


Figura 32: Curva de reducción de Arsénico en agua

Según la caracterización fisicoquímica inicial del agua subterránea del pozo de agua del distrito de la Punta de Bombón, la concentración de arsénico fue de 0,07 ppm, los valores de arsénico fueron corregidos de acuerdo al porcentaje de reducción obteniéndose una concentración de arsénico después de 5 horas de tratamiento de 0,0642; tras 10 horas 0,06; y tras 24 horas de tratamiento 0,0587 ppm, como se aprecia en la tabla 22.

Tabla 22: Concentraciones de Arsénico corregidas para agua subterránea de Punta de Bombón

Tiempo de retención, horas	Concentración de Arsénico en agua, ppm
0	0,0700
5	0,0642
10	0,0626
24	0,0587

El tiempo requerido para reducir la concentración de arsénico podría ser muy prolongado, ya que los resultados muestran que a 24 horas se obtuvo un porcentaje de reducción de 16,08%, diferentes estudios demuestran una disminución considerable por métodos biológicos a los 6 días de tratamiento. ⁽⁷⁷⁾ Sin embargo, el tiempo de funcionamiento puede verse afectado por las condiciones tales como pH de la solución, temperatura, fuerza iónica, la formación de biopelícula, velocidad de agitación, etc. ⁽⁷⁸⁾ Dado que se trata de agua subterránea usada para consumo humano, un proceso de potabilización en una planta de tratamiento no puede ser extenso, las referencias. ⁽⁷⁹⁾ indican un máximo de 3 horas en el proceso. Por lo tanto el sistema MBBR no sería recomendable para el tratamiento de agua potable, sin embargo presentaría alto potencial para el tratamiento de otro tipo de efluentes.

Existen alrededor de 14 tecnologías para remover arsénico del agua con eficiencias que van desde 70 hasta 99%. ⁽⁸⁰⁾ Las técnicas empleadas son a través de la: Óxido Reducción, Separación sólido líquido (Adsorción, Ablandamiento con cal, Coagulación Adsorción filtración, Intercambio iónico), Separación física (Electrodiálisis inversa, Osmosis inversa y nano filtración) y Procesos biológicos (Fitorremediación y Biofiltración). Sin embargo para efecto de comparación nos centraremos en los métodos por proceso biológicos.

El sistema biológico más estudiado es el de la filtración biológica. Un filtro biológico de arena es un recipiente que presenta una capa biológicamente activa, la cual demora de una a dos semanas en desarrollarse completamente, esta capa bioactiva ayuda a filtrar, adsorber, destruir o inactivar patógenos. Usualmente, se coloca una placa porosa encima de la arena para no perturbar la capa bioactiva al agregar el agua. En el sistema el arsénico se adsorbe sobre las partículas de óxido férrico añadidas y luego se filtra. ⁽⁸¹⁾

La actividad bacteriana puede jugar un papel catalizador importante en varios de los procesos de remoción de As, pero se conoce poco sobre la viabilidad del uso de procesos biológicos para eliminar el As en agua. Estudios a escala piloto muestran que condiciones óptimas de pH, temperatura y oxígeno permiten la filtración biológica y eliminación simultánea de As (III) y hierro. El

parámetro crítico es la concentración inicial de hierro. A mayor concentración de este, la eficiencia de la remoción del As llega a ser >90%, y a menor concentración, la eficiencia es de aproximadamente 40%.⁽²¹⁾

El porcentaje de reducción obtenido en el presente estudio (usando el sistema MBBR) difiere mucho con un sistema de biofiltro, haciendo al sistema probado muy poco viable a un nivel comercial, la presente investigación pretendió innovar y su principal importancia se centra en el conocimiento aportado sobre el comportamiento del sistema MBBR tratar agua subterráneas con alta concentración de arsénico.

Implementar el uso de biofiltros suplementados con microorganismo que presentan mecanismos para la resistencia a arsénico y alta afinidad a este, como los aislados en el presente estudio, podría ser investigado, así como la implementación de microorganismos que ocasione una mayor disponibilidad del hierro.

El tratamiento discutido es la primera de numerosos pasos para las aplicaciones de remoción de arsénico de aguas subterráneas. Recientemente, un método para eliminación de arsénico, libre de productos químicos fue utilizado en una aldea de Bengala Occidental⁽⁸²⁾ para eliminar Arsénico partir del agua subterránea contaminada usada para beber. Dicho tratamiento se basa en el principio de los procesos de oxidación por bacterias e infiltración para eliminar arsénico, así como Fe y Mn, de las aguas subterráneas con elevado valores de reducción-oxidación.⁽⁸²⁾ Combinando el uso de los microorganismos aislados en el presente trabajo, con el experimento de campo mencionado, la remoción de As de las aguas subterráneas por bacterias podría ser una alternativa potencial para tratamientos futuros.

El presente trabajo está en una etapa muy temprana en el proceso de desarrollo de un tratamiento para la aplicación práctica como la eliminación de las aguas subterráneas. La Biodepuración de áreas contaminadas proporciona un aspecto potencial de desarrollo futuro debido a su compatibilidad y rentabilidad.

Este estudio llevó a cabo el examen de una tecnología alternativa para la eliminación de a partir de las aguas subterráneas. Hemos logrado aislar bacteria

de un acuífero contaminado arsénico, las cepas *Bacillus Subtilis*, *Bacillus Lentus*, *Bacillus Cereus*, *Pleisomona spp*, y *Pseudomona spp*, las cuales fueron altamente resistentes a las concentraciones de arsénico estudiadas. Esta información es crucial, ya que la tecnología de biorremediación efectiva depende significativamente de la actividad de los microorganismos nativos en los sitios contaminados. Por lo tanto, estos microorganismos son una alternativa potencial para la biordepuración de arsénico contaminado las aguas subterráneas en la región de la Punta de Bombón.

4.11. DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA DE CULTIVOS RESISTENTES

Se realizó las curvas de crecimiento para la colonia en consorcio CAs1, y las colonias CAs2, CAs3 y CAs5, el procedimiento fue realizado, antes de realizar la identificación bacteriana, los resultados obtenidos se muestran en la figura 33.

Se observó la cinética de crecimiento bacteriana, en la cual las curvas muestran: una fase lag, fase de crecimiento exponencial y una fase estacionaria, el tiempo de duración de cada una de estas fases para las 4 colonias estudiadas se muestran en la tabla 23.

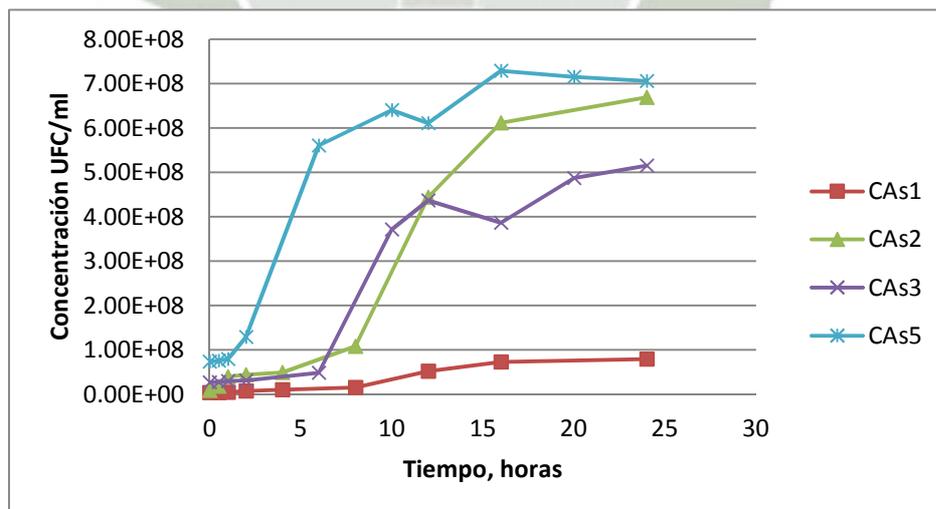


Figura 33: Curvas de Crecimiento bacteriano

Se observó que las colonias que presentaron mayor concentración de microorganismos bajo las condiciones ensayadas fueron las colonias CAs5 y CAs2, una concentración moderada de la colonia CAs3 y poca concentración de microorganismos en la colonia CAs1 a diferencia de las anteriores.

Tabla 23: Fases de crecimiento bacteriano.

	Tiempo , h			
	CAs1	CAs2	CAs3	CAs5
Fase lag	0-8	0-8	0-6	0-2
Fase exponencial	8-16	8-16	6-12	2-6
Fase estacionaria	16-24	16-24	12.-24	6-24

En relación a las resistencias evaluadas en placa se pudo observar que la colonia CAs2 era la que presentó menor resistencia o adaptación al medio, sin embargo su cinética de crecimiento mostró que después de 8 horas de fase de latencia (lag) la concentración de microorganismos fue incrementando rápidamente, posiblemente debido al uso de caldo nutritivo y la concentración usada en la presente prueba (200ppm de arsenito de sodio) fue mucho menor a la CIM.

La colonia CAs2 y el consorcio CAs1 requieren mayor tiempo para iniciar su fase exponencial (6-12h), mientras que las colonias CAs3 y CAs5(2-6h) entran en fase exponencial rápidamente, asimismo estas colonias son las que presentaron mayor resistencia o adaptación al arsenito de sodio, mostrando así su afinidad por el arsénico.

4.12. OBTENCIÓN DE LA BIOMASA

Algunos estudios han demostrado que en ecosistemas acuáticos la concentración de biomasa inmovilizada es superior a la encontrada en un sistema donde la biomasa se encuentra libre. ⁽⁸³⁾ Esto posiblemente se deba a que en los sistemas de agua, la biomasa puede ser arrastrada impidiendo que se mantenga o aumente su concentración. Así mismo varios estudios han demostrado que el

metabolismo de las células inmovilizadas es mucho mayor en comparación al presentado por células libres. ^(84,85)

El incremento en la actividad metabólica, puede deberse a diferentes factores ⁽⁴⁷⁾, gracias al incremento de la biomasa en el soporte, así como la concentración de nutrientes alrededor del soporte, permitirán que se presente este incremento. De igual forma debido a que tanto el soporte como la misma biopelícula que algunos de estos microorganismos forman, atrapan gran parte de los nutrientes y sustancias presentes en el medio, estos estarán más disponibles para las células inmovilizadas, que si estuvieran libres. ⁽⁸³⁾

La inmovilización de la biopelícula se llevó a cabo a través de soportes de PEHD, para lograr obtener una biopelícula estable y considerando que el crecimiento inicial de la película podrá necesitar varias semanas para alcanzar su desarrollo sobre el soporte ⁽⁷⁷⁾, se estableció como tiempo de formación de biopelícula 4 semanas, en la figura 34 se aprecia los soportes a las 4 semanas de inoculación del consorcio bacteriano



Figura 34: Soportes PEDH con formación de biopelículas

Para la formación de la biopelícula se utilizó un semillero el cual fue instalado y operado de acuerdo a las especificaciones de método, el semillero tubo una capacidad de 2 litros aproximadamente, presento agitación constante ocasionada por entrada de aire comprimido al sistema, el sistema estuvo sellado para evitar la contaminación externa y solo presento una salida, la cual se conectaba a un recipiente con agua estéril, la función fue evacuar la generación de posibles gases. En la figura 35 el semillero usado para la generación de la biopelícula.

Entre el 1 y 3 % del peso seco de la célula bacteriana corresponde a fósforo (P), el cual es aproximadamente un quinto del contenido de nitrógeno (N) que requiere la célula. El fósforo es necesario en la célula bacteriana para la síntesis de ácidos nucleicos, ATP y generación de membranas celulares, mientras que, el N es utilizado para la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos, por lo tanto, son elementos esenciales en la formación de nuevas células ⁽⁸⁷⁾ y biopelículas, se utilizó caldo nutritivo para generar el crecimiento de la biopelícula, en el cual el extracto de carne y la peptona constituyeron la fuente de carbono, nitrógeno y fósforo.



Figura 35: Semillero para la producción de biopelícula

4.13. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LAS AGUAS BIODEPURADAS EN ARSENICO A LA SALIDA DEL SISTEMA MBBR.

La calidad fisicoquímica del agua fue evaluada antes del tratamiento y a las 24 horas de este, obteniéndose los datos de la calidad del agua tras 24 horas de tratamiento en la Tabla 24, donde se muestra los resultados de pH, temperatura, conductividad, STD, porcentaje de salinidad, cloruros, dureza total, turbiedad y sulfatos.

Se realizó la prueba de hipótesis, a través de la comparación de medias para evaluar si las diferencias de los resultados obtenidos antes y después del tratamiento eran significativas, las medias y las desviaciones estándar se

muestran en la tabla 32, se determinó que no hubo diferencia significativa para la conductividad, sólidos totales disueltos, salinidad y cloruros; a diferencia de los parámetros pH, temperatura, oxígeno disuelto, dureza total, turbiedad y sulfatos en los cuales se obtuvo una diferencia significativa con una significancia menor a 0,05; como se observa en la tabla 33.

La reducción de pH fue de 0,4, siendo una reducción estadísticamente significativa la reducción de pH indica la reducción de concentración de iones de hidrógeno [H⁺], lo cual pudo deber a que cuando el material orgánico se descompone se libera dióxido de carbono. El dióxido de carbono se combina con agua para formar ácido carbónico. Aunque se trata de un ácido débil, grandes cantidades de la misma disminuye el pH ⁽⁸⁸⁾

La temperatura se redujo 1,23 °C la variación de temperatura del agua se debió a factores ambientales, ya que el reactor utilizado no presentó aislamiento térmico. La temperatura en agua para consumo humano es un parámetro para el cual no se ha establecido un límite máximo permisible como se aprecia en la tabla 25 (anexo1)

La conductividad (CND) es una medida de la capacidad que tiene una muestra de agua de transmitir la corriente eléctrica. Este parámetro depende de la concentración total de sustancias iónicas disueltas en el agua y la temperatura a la cual se hace la medida. Afectan esta medida la naturaleza de los distintos iones disueltos, sus valencias y sus concentraciones reales o relativas. ⁽⁸⁹⁾ La medida de sólidos totales disueltos (TDS) es un índice de la cantidad de sustancias disueltas en el agua, y proporciona una indicación general de la calidad química. Los principales aniones inorgánicos disueltos en el agua son carbonatos, bicarbonatos, cloruros, sulfatos, fosfatos y nitratos. Los principales cationes son calcio, magnesio, sodio, potasio, amonio, etc. ⁽⁹⁰⁾; de lo anterior se infiere que el agua de punta de bombón no presentó una reducción significativa de iones disueltos tras el tratamiento. Los parámetros CND y STD se encontraron inicialmente y tras el tratamiento por debajo del LMP 1500 µS/cm y 1000 mg/L respectivamente, como se presenta en la tabla 24.

La salinidad es una medida de la cantidad de sales disueltas en agua. La salinidad y la conductividad están relacionadas porque la cantidad de iones disueltos aumentan los valores de ambas. ⁽⁹¹⁾ El porcentaje de salinidad tras el tratamiento no presentó cambios significativos. Lo cual indica que no se presentó cambio en las sales disueltas en el agua. La normativa peruana no establece un LMP para este parámetro.

El oxígeno disuelto presentó una reducción 0,2 ppm, dato estadísticamente significativo, lo cual podría indicar el requerimiento de oxígeno de los microorganismos *Bacillus Subtilis*, *Bacillus Lentus*, *Bacillus Cereus*, *Pleisomona spp* *Bacillus megaterium*, y *Pseudomona spp*, los cuales conformaron la biopelícula., los microorganismos señalados son aerobios, y presentan una demanda biológica de oxígeno (DBO) pero adicionalmente se debe considerar la demanda, química de oxígeno.

Tabla 24: Comparación de la calidad fisicoquímica del agua de Punta de Bombón antes y después del tratamiento.

	Antes del tratamiento	Con 24 horas de tratamiento	LMP*
pH, unidad de pH	7,38	6,98	6,5 -8,5
Temperatura, °C	11,46	10,23	-
Conductividad, µS/cm	1226	997	1500
STD, mg/L	613	498	1000
% Sal	0,61	0,40	-
OD, mg/L	3,0	2,8	-
Turbiedad ,UNT **	110	115	5
Cloruros, mg/L**	650,25	633,6	250
Sulfatos, mg/L**	616,74	648,8	250
Dureza total mg/L **	695,38	634,1	500

*Según el Anexo N° 1

**Determinación según el método descrito en el apartado 3.4.2.

La turbidez aumento 5 UNT, debido probablemente al desprendimiento paulatino de la biopelícula o de biomasa muerta del sistema,

previamente inmovilizada, cabe resaltar que el valor inicial fue de 110 NTU sobrepasando ampliamente los límites máximos permisibles para el consumo humano, antes y después del tratamiento.

Los cloruros presentaron una reducción de 16,65 ppm,. La reducción la concentración inicial de cloruros en agua fue 650,25 ppm y la final 633,6 ppm, siendo que en Perú el LMP es 250 ppm en ambos casos la concentración de cloruros fue muy alta. Las concentraciones de cloruro excesivas aumentan la velocidad de corrosión de los metales en los sistemas de distribución, aunque variará en función de la alcalinidad del agua, lo que puede hacer que aumente la concentración de metales en el agua. No se propone ningún valor de referencia basado en efectos sobre la salud para el cloruro en el agua de consumo. No obstante, las concentraciones de cloruro que excedan de unos 250 ppm pueden conferir al agua un sabor perceptible. ⁽⁴²⁾

La concentración inicial de sulfatos en el agua fue de 616,74 ppm y la concentración después del tratamiento 648,8 ppm, el tratamiento ocasiono un aumento de 32,06 ppm. Las concentraciones inicial y final estuvieron sobre el LMP 250 ppm, El umbral del sabor para el sulfato de sodio y sulfato de calcio en agua es: 250 mg/l y 100 mg/l respectivamente, valores ampliamente superados, por lo que se tiene un sabor amargo o medicinal .El sulfato es uno de los aniones menos tóxicos; sin embargo, en grandes concentraciones, se han observado, deshidratación e irritación gastrointestinal .Las personas que no están acostumbradas a beber agua con niveles elevados de sulfato pueden experimentar diarrea y deshidratación. Los niños son a menudo más sensibles al sulfato que los adultos. Como precaución, aguas con un nivel de sulfatos superior a 400 mg/l no deben ser usadas en la preparación de alimentos para niños. Niños mayores y adultos se acostumbran a los niveles altos de sulfato después de unos días. ⁽⁴²⁾

La dureza total se redujo 61,28 ppm, de 695,38ppm a 634,1 ppm, posiblemente debido a interacciones de los iones calcio y magnesio con la biopelícula y la absorción de estos dentro de la célula. La dureza total del agua tras y después del tratamiento se encontraron sobre el LMP para consumo humano 500 ppm como se aprecia en la tabla 25 (anexo 1) La dureza de agua, es

la cantidad total de sales de calcio y magnesio en una muestra de agua. El valor del umbral gustativo del ión calcio se encuentra entre 100 y 300 mg/l, dependiendo del anión asociado, mientras que el del magnesio es probablemente menor que el del calcio. Las aguas duras, al calentarlas, forman precipitados de carbonato cálcico. Por otra parte, las aguas blandas, con una dureza menor que 100 mg/l, pueden tener una capacidad de amortiguación del pH baja y ser, por tanto, más corrosivas para las tuberías. ⁽⁹²⁾

La reducción del arsénico en agua fue evaluado en el apartado 4.7, encontrándose tanto antes y después del tratamiento sobre el LMP 0,01 ppm El Arsénico se considera una sustancia a la que debe darse una prioridad alta en el análisis sistemático de fuentes de agua potable para consumo humano. Es una de las pocas sustancias que se ha demostrado que producen cáncer en el ser humano por consumo de agua potable. Cuando la ingestión es mayor que la excreción, se bioacumula y potencia su efecto negativo; los efectos de la exposición aguda al arsénico son alteraciones gastrointestinales, cardiovasculares, nerviosas, renales y hepáticas. ⁽⁴²⁾

Los efectos de la exposición crónica medio del agua de bebida, causa lesiones muy características. Se presentan hipocromias e hiperchromias (en forma de gota de agua) principalmente en las partes no expuestas del cuerpo, hiperqueratosis palmoplantar, así como lesiones ulceradas compatibles con un diagnóstico de carcinoma epidermoide. Además de cáncer de piel, estomago, hígado, riñones, vejiga y próstata, cirrosis, hemoangioendotelioma, problemas de reabsorción renal, inhibición de la síntesis de la porfirina, afectación a los glóbulos blancos, abortos espontáneos, neuropatía periférica, parálisis, pérdida de la audición, inhibición de algunas enzimas, inhibición de la fosforilación oxidativa y de la reparación del ADN, daños al intestino. ⁽⁴²⁾⁽³⁾⁽¹²⁾ La intoxicación por Arsénico se manifiesta de forma característica a lo largo de un periodo de 5 a 20 años. La OMS propone un valor guía provisional de 0,01 mg/l. Este valor coincide con lo establecido en el D. S. 031-2010-SA Reglamento de la Calidad del Agua para Consumo Humano. ⁽⁴²⁾

Los parámetros de pH, conductividad, sólidos totales disueltos se encontraron dentro de los LMP para consumo humano. y tras el tratamiento continuaron en la misma condición. La turbiedad, cloruros, sulfatos y dureza total, se encontraron inicialmente sobre su respectivo LMP y tras el tratamiento se mantuvieron ampliamente sobre estos. Como se observa en la tabla 24, asimismo en el anexo 1 se encuentran los parámetros de evaluación de calidad de agua y sus Límites máximos permisibles (LMP) según el DS 031-2010-SA. Por tanto a medida de comparación entre los resultados obtenidos y la normativa actual referente a la calidad de agua de consumo humano podemos concluir que tras el tratamiento con el sistema MBBR, no se obtuvieron resultados importantes respecto a la calidad de agua.



CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

PRIMERA.- Se biodepuró en forma parcial arsénico en aguas contaminadas del distrito de Punta de Bombón de 0,070 ppm de arsénico total a 0,0587 ppm, usando un biorreactor de lecho móvil MBBR con carga bacteriana extremófila aislada del geiser Coalaque.

SEGUNDA.- Se aisló e identificó las cepas *Bacillus Subtilis*, *Bacillus Lentus*, *Bacillus Cereus*, *Pleisomona spp* *Bacillus megaterium*, y *Pseudomona spp*, procedentes del geiser ubicado en el distrito de Coalaque, Departamento de Moquegua.

TERCERA.- Se determinó la resistencia *in vitro* de las 6 cepas obtenidas del geiser ubicado en el distrito de Coalaque, Departamento de Moquegua; las cepas *Bacillus Subtilis*, *Bacillus Lentus*, *Bacillus Cereus*, trabajadas en consorcio presentaron una concentración inhibitoria mínima de 2000 ppm de arsenito de sodio; *Pleisomona spp* ,1600 ppm de Arsenito de sodio; *Bacillus megaterium*, y *Pseudomona spp.*, 6000ppm de arsenito de sodio.

CUARTA.- Se diseñó un reactor de biopelícula de lecho móvil (MBBR), usando el consorcio de seis microorganismos resistentes a arsénico, provenientes de aguas del geiser ubicado en el distrito de Coalaque, departamento de Moquegua.; se evaluó el sistema (MBBR) el cual biodepuró parcialmente la concentración de arsénico de las aguas subterráneas del distrito de Punta de Bombón; con un porcentaje de reducción de arsénico de 16,08 % a las 24 horas de tratamiento , a las 10 horas 10,47%, y a las 5 horas 8,32%.

CAPÍTULO VI

RECOMENDACIONES

- ❖ Es necesario la bioestimulación para la generación de concentraciones suficientes de bacterias para la biodepuración. Por ejemplo, las fuentes de carbono o ingredientes complejos como extracto de levadura pueden ser necesarios.
- ❖ Hay muchas alternativas de soportes orgánicos disponibles, los cuales podrían ser también materia de investigación. Utilizar los microorganismos aislados con otros tipos de sistemas.
- ❖ Realizar una secuenciación molecular de las cepas nativas con el objetivo de identificar los genes responsables de la resistencia a arsénico.
- ❖ Probar las cepas descritas en este trabajo en aguas residuales como por ejemplo efluentes mineros.
- ❖ Los microorganismos estudiados en el presente trabajo pueden ser considerados como una alternativa para futuras investigaciones, que aborden el tema de los mecanismos por los cuales estos realizan la depuración de arsénico en agua.

REFERENCIAS

1. Stanley M. Introducción a la química ambiental. 1ª ed. Barcelona, España: Editorial Reverté, S.A; 2007.
2. Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades ATSDR, Resumen de Salud Pública – Arsénico, Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU, 2007.
3. Herbello P. Especiación de metales pesados mediante formación de quelatos. distribución de las especies inorgánicas de As y Cr en la ría de Arousa. 1ª ed. Universidad Santiago de Compostela; 2007.
4. Smedley P., Kinniburgh, D. A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. Appl. Geochem. 17; 2002, pp. 517–568.
5. Brookins, D.G. Eh-pH Diagrams for Geochemistry. Springer-Verlag, Berlin; 1988.
6. Hasegawa H., Matsui M., Okamura S., Hojo M., Iwasaki N., Sohrin Y. Arsenic speciation including “hidden” arsenic in natural waters. Appl. Organomet. Chem. 13 ed; 1999, pp. 113–119.
7. IBEROARSEN, Metodologías analíticas para la determinación y especiación de arsénico en aguas y suelos, Editado por CYTED; 2006
8. Mandal, b., Suzuki, K.: Arsenic round the world: a review. Talanta 58; 2002, pp. 201–235
9. Mateos L. *Corynebacterium glutamicum* as a model bacterium for the bioremediation of arsenic. International microbiology. vol 9; 2006, pp. 207-215.
10. Guerrero A. Toxicología. 1ª ed. Bogotá: Editorial Manual Moderno; 2000, pp. 248-252.
11. Navoni JA, De Pietri D, Garcia S, Villaamil Lepori EC. Riesgo sanitario de la población vulnerable expuesta al arsénico en la provincia de Buenos Aires, Argentina. Rev Panam Salud Pública. 2012; 31(1):1–8.
12. Cáceres R. Proceso en lecho fijo de hierro metálico para la eliminación de arsénico de aguas en pequeñas instalaciones. 1ª ed. San Juan; 2007. 110 p.

13. Perú, Ministerio del Ambiente. Decreto Supremo N° 002- 2008-MINAM. Estándares nacionales de calidad ambiental para agua. Lima: Ministerio del Ambiente; 2008.
14. Reglamento de la calidad de Agua para Consumo Humano: D.S. N° 031-2010-SA / Ministerio de Salud. Dirección General de Salud Ambiental – Lima: Ministerio de Salud.1a ed. Lima, Perú; 2011,44 p.
15. U.S. Environmental Protection Agency. Fact Sheet: Drinking water standard for arsenic. Washington DC: EPA; 2001
16. Castro de Esparza ML. Presencia de arsénico en el agua de bebida en América Latina y su efecto en la salud pública. In: International Congress: Natural Arsenic in Groundwaters of Latin America. Ciudad de México; 2006
17. Castro M.L. Remoción del arsénico en el agua para beber y biorremediación de suelos. International Congress, Mexico City, 1-20. 2006.
18. Johnston, R.; Heijnjen, H.; Wurzel, P. Arsenic in Drinking Water, Cap. 6: Safe Water Technology, OMS, Final Draft; 2001.
19. Joshi, A and Chaudhuri, M. Removal of arsenic from Ground Water by Iron Oxide Coated Sand. Jour. of Env. Eng.; 1996, 122(8), 769
20. Parra, S. (2001). Combinación de procesos fotocatalíticos y biológicos como contribución a la detoxificación del agua. En: Revista VirtualPro. 3: 10.
21. Lehimas F., Chapman, I., Bourguine, P.,. Use of Biological Processes for Arsenic removal: a Cost Effective Alternative to Chemical Treatment for As+3 in Groundwater. 1992.
22. Bencheikh-Latmani, R. Practical Applications of Bacteria-Metal interactions. Institution of Oceanography University of California San Diego, Conference in Lima, Perú. 2003.
23. U.S.EPA. Arsenic treatment technologies for soil waste and water Tech.Report. Cincinnati: National Service Center for Environmental Publications (NSCEP);2002. No. EPA: 542-R-02-004
24. Paéz D., Tamames J., De Lorenzo V., Cánovas D., Microbial Responses to Environmental Arsenic. Biometals. 2009; 22. pp 117-130.

25. Vullo D. Microorganismos y metales pesados: una interacción en beneficio del medio ambiente. Química Viva. Buenos Aires, Argentina. Diciembre 2003; 03(02), pp 93-104.
26. Moreno S., Bayo J. Diseño de Biorreactores y Enzimología. España: Universidad de Murcia ; 2009, 248 p.
27. Scraag, A. 2002. Biotecnología para ingenieros: sistemas biológicos en procesos tecnológicos. Ed. Limusa
28. Metcalf and Eddy, Inc., Wastewater Engineering: Treatment, Disposal and Resue, 4a ed. New York: Tchobanoglous, G., Burton, F.L., and Stensel, D.H. McGraw-Hill; 2003.
29. Dupla M., Comeau Y., Parent S., Villemur R., Jolicoeur M. Design optimization of a selfcleaning moving-bed bioreactor for seawater denitrification. Water Res.; 2006, 40, pp. 249-258.
30. Plattes M., Fiorelli D., Gille S., Girard C., Henry E., Minette F., *et al.* Modelling and dynamic simulation of a moving bed bioreactor using respirometry for the estimation of kinetic parameters. Biochem. Eng. J. 33; 2007, pp. 253-259
31. Alvarez M, Mavares D., Construcción de Reactor Biopelícula con Soportes Móviles y Membranas para el Tratamiento de Aguas Residuales. Revista Digital de Investigación y Postgrado de la Universidad Nacional Experimental Politécnica “Antonio José de Sucre”, Vicerrectorado Barquisimeto. Venezuela. junio 2012: 2(.2): 143-152.
32. Zalakain y G., Manterola G., Procesos avanzados de biomasa fija sobre lecho móvil para el tratamiento de aguas residuales en la industria farmacéutica. Veolia Water Solutions & Technologies-AnoxKaldnes. 2011; 166:98-102.
33. Rodríguez, J. M.,: Eliminación de la Materia Orgánica y del Nitrógeno en el Agua Residual Urbana Mediante Lechos Inundados.[Tesis doctoral], Universidad de Granada. Instituto del Agua. Dpto. de Ingeniería Civil – Dpto. de Microbiología. Granada, España;2001.

34. Zalakain y G., Manterola G., Procesos avanzados de biomasa fija sobre lecho móvil para el tratamiento de aguas residuales en la industria farmacéutica. Veolia Water Solutions & Technologies-AnoxKaldnes. 2011; 166:98-102.
35. Petersohn A., Brigulla M., Haas S., Hoheisel J., Lker U. & Hecker M. 2001. Global Analysis of the General Stress Response of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*. 183: 5617–5631
36. Stephens C. 1998. Bacterial sporulation: A question of commitment. *Current Biology*. 8: 45-48.
37. Madigan MT., Martinko JM., Parker J. Brock Biology of Microorganisms. 10a ed. España: Pearson Prentice Hall Lippincott; 2004.
38. Vetter World [homepage en Internet]. Argentina: Gustavo Cieslar ; c2003 [actualizada 15 febrero 2012; consultado 16 setiembre 2014]. Disponible en: http://www.oocities.org/ar/vetterworld/microbiologia/b_plesiomonas.htm
39. Pimienta Jean: LA CAPTACIÓN DE AGUAS SUBTERRÁNEAS. 1ª Edición. 1990. Editores Técnicos Asociados. Barcelona, España.
40. CTDS SAC. Ciencia y Tecnología para el Desarrollo Sostenible, Declaración de impacto ambiental Proyecto de Exploración Minera Kajol, Arequipa; 2012.
41. INEI, XI Censo de Población y V Censo I de Vivienda, Perú; 2007
42. Proyecto Local, Consultora OIKOS. Evaluación de la Calidad der agua del rio Tambo, Arequipa; 2011
43. INDECOPI: .NTP-ISO- 5667-3:2001 Calidad de Agua: Muestreo .Parte 3: Guía para la preservación y manejo de muestras, 2ª Ed. Lima: INDECOPI; 2001.
44. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, Joint Editorial Board, American Public Health Association, American Waterworks Association, and Water Environment Control Federation: 20th Edition, 1998-
45. Jave J.M. Guía de microbiología. Arequipa: Universidad Católica de Santa Maria; 2008

46. . Bergey, David H.; John G. Holt; Noel R. Krieg; Peter H.A. Sneath. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Lippincott Williams & Wilkins; 9th ed.; 1994.
47. Madigan MT., Martinko JM., Parker J. Brock Biology of Microorganisms. 10a ed. España: Pearson Prentice Hall Lippincott; 2004.
48. Procedimientos de identificación bacteriana. Sistemas manuales y automáticos. últimas tendencias de identificación. [Monografía en internet]Madrid, España; 2005 [Consultado 06 Mayo 2014].[1-20p.].Disponible en:<http://www.preparadores.eu/temamuestra/ptecnicos/diagnostico.pdf>.
49. Pruebas de identificación, <http://edicionmicro.usal.es/web/identificacion/AyudaPruebas.html>.
50. Ejercicio5:Actividades Bioquímicas en Bacterias http://www.cedip.edu.mx/tesinas/tesis_uam/Las%20Lipazas%20como%20catalizador%20para%20la%20produccion%20de%20Biodisel.pdf.
51. INDECOPI. NTP 214.006:1999 Agua para Consumo Humano. Determinación de nitratos. Método espectrofotometrico, 2ª Ed. Lima: INDECOPI; 2000.
52. Environmental protection agency –EPA. Method 200.7 Determination of Metals and Trace Elements in Water and Wastes by Inductively Coupled Plasma-atomic Emission Spectrometry. Cincinnati: Environmental protection agency –EPA; 1994, En: http://www.caslab.com/EPA-Methods/PDF/200_7.pdf.
53. INDECOPI. NTP 214.029:2000 Agua ara Consumo Humano Determinación de pH. Método electrométrico. 1ª ed.Lima: INDECOPI; 2000.
54. SUNASS; Guía para la evaluación de calidad de agua para consumo humano, Lima: SUNASS, 2003.
55. INDECOPI. NTP 214.006:1999 Agua para Consumo Humano. Determinación de turbiedad. Método nefelometrico, 2ª Ed. Lima: INDECOPI; 2000.
56. INDECOPI, NTP 214.021:1988 AGUA POTABLE. Determinación de cloruros. Método Argentométrico. 1 ra ed.Lima: INDECOPI;2011

57. INDECOPI.NTP 214.028:2000 Agua para Consumo Humano. Determinación de Sulfatos. Método turbidimetrico, 2ª Ed. Lima:INDECOPI; 2000
58. Valderrama MR, Práctica N° 1 Determinación de la Fase Exponencial en Procariote Arequipa: Universidad Católica de Santa María,; 2010.
59. EdmundsWM. Cook, JM.,Kinniburgh DG.,Miles D.L., Trafford J.M., Tracelement. Occurrence in British .,British Geological Survey; 1989
60. Smedley P.L., Kinninburgh D.G., A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. Applied Geochemistry. 2002;17(5): 517-568.
61. Ravenscroft P., Brammer H.,Richards K. ,Arsenic Pollution: A Global Synthesis [Monograph on the Internet].UK: RGS-IBG Book Series.2009 [cited 7 aug. 2014] Available from <http://www.wiley.com/WileyCDA/WileyTitle/productCd-1444355465.html>
62. Gobierno de Japón, el Ministerio de Salud, Trabajo y Bienestar de la Farmacopea Suplemento 15a edición japonesa 2. Ministerial de la Notificación N ° 425, p. 20.
63. Aquiahuatl Ma.[página principal de internet]. México: Universidad Autonoma Meropolitana –Unidad Iztapalapa ; c2012 [actualizado 2012 ; citado 2014 set 20]. División de ciencias biológicas y de la salud [aprox. 2 pantallas]. Disponible en:
http://www.izt.uam.mx/ceu/publicaciones/MMBG/files/manual_microbiologia_general.pdf.
64. MDM Cientifica.Agar Plate Count [Página principal de internet] .[actualizado 2010 dic 1; citado 2014 set 1] Metodos de Diagnostico Microbiológico [aprox 2 pantallas] Disponible en http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:MnlSk2I_sy0J:mdmciencia.com/productos/index.php%3Fcontroller%3Dattachment%26id_attachment%3D22+&cd=10&hl=es&ct=clnk&gl=pe

65. Koneman E, Allen S, Janda W, Schreckenberger P, Winn W. Diagnóstico microbiológico. Texto y Atlas Color. 5ª ed. España: Médica Panamericana; 2001.
66. Bentley R, Chasteen TG. 2002. Microbial methylation of metalloids: arsenic, antimony, and bismuth. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66:pp 250–71.
67. Suchanda B., Sudeshna D., Dhruvajyoti C., Priyabrata S. Arsenic accumulating and transforming bacteria isolated from contaminated soil for potential use in bioremediation. *Journal of Environmental Science and Health, part a: toxic/hazardous substances and environmental engineering.* 16 dec 2011; 46(14), pp 1736-1747. <http://dx.doi.org/10.1080/10934529.2011.623995>
68. Rehman A., Butt S.A., Hasnain S. Isolation and characterization of arsenite oxidizing *Pseudomonas lubricans* and its potential use in bioremediation of wastewater. *Afr. J. Biotechnol.* 2010; 9, 1493–1498.
69. Krumova K., Nikolovska M., Groudeva V. Isolation and Identification of Arsenic- Transforming Bacteria from Arsenic Contaminated sites in Bulgaria. : *BIOTECHNOL. & BIOTECHNOL.*; 22 feb 2008. 721-728
70. Bachete S.P., Cavalca L., Andreoni V. Arsenic-resistant bacteria isolated from agricultural soils of Bangladesh and characterization of arsenate-reducing strains. *Journal of Applied Microbiology.* 2009; 107. pp 145–156
71. Aaltonen E. Prokaryotic Arsenic Resistance- Studies in *Bacillus Subtilis*. [Doctoral Dissertation]. Illinois , Chicago: Emil Aaltonen; 2008
72. IOSR. *Journal Of Environmental Science, Toxicology And Food Technology (IOSR-JESTFT)* e-ISSN: 2319-2402, p- ISSN: 2319-2399. Volume 3, Issue 1 (Jan. - Feb. 2013), pp 01-10. www.Iosrjournals.Org.
73. Extracto: "Ciencias de la Tierra 8 Edición – Una Introducción a la Geología física. Edward.J.Tar buck, Frederick.K.Lutgens"[setiembre, 2014]. Disponible en http://www.rutageologica.cl/index.php?option=com_content&view=article&id=393&Itemid=95&showall=1.
74. Ramos R, Sepulveda R., Villalobos M., El agua en el medio ambiente: muestreo y análisis, Mexico :Plaza y Valdes S.A; 2003.

75. INRENA, Ministerio de Agricultura, diagnóstico de la calidad del agua de la vertiente del pacífico, Cuenca del Rio Tambo.[setiembre,2014].Perú. Disponible en: http://www.cepes.org.pe/pdf/OCR/Partidos/diagnostico_calidad_aguatomo2/diagnostico_calidad_agua_cuenca_rio_tambo.pdf.
76. Rasmussen V, Miljotejnolosi AS, The Kaldnes Moving BedTM biofilm process- an innovative solution to biological waste water treatment, Norway;2011.
77. A.-C. Kao et al. Removal of arsenic from groundwater by using a native isolated arsenite-oxidizing bacterium *Journal of Contaminant Hydrology*; 2013, 155,pp 1–8.
78. Vijayaraghavan K., Yun Y.S., Bacterial biosorbents and biosorption. *Biotechnol* .2008; 26, 266–291.
79. Segura D., Proyecto de planta potabilizadora para agua potable en cidade velha.cabo verde. [Tesis].Cartagena: Universidad Politécnica de Cartagena; 2012.
80. Petrusovski B., Sharma S., Schippers J.C. y Shordt K.Arsenic in Drinking Water.Thematic Overview Paper 17. IRC; 2007, pp. 1-61.
81. Gottinger, A. M.; Wild, D. J.; McMartin, D.; Moldovan, B.; Wang, D.,Development of an iron-amended biofilter for removal of arsenic from rural Canadian prairie potable water, Brebbia, C. A.;Marinov, A. M.,*Water pollution X 2010* pp. 333-344
82. Sen Gupta B., Chatterjee S., Rott U., Kauffman H., Bandopadhyay A., DeGroot, W., *et al*. A simple chemical free arsenic removal method for community water supply — a case study from West Bengal, India: Carbonell-Barrachina, A.A., Mukherjee, S.; 2009. 157, 3351–3353
83. Cohen Y., Biofiltration - the treatment of fluids by microorganisms immobilized into the filter bedding material. *Bioresource Technology*. 2001; 77: 257-274.

84. Polprasert, C., Organic Waste Recycling. Wiley. Bioresource Technology. 2001; 77: 257-274.
85. Angelova M.B., Pashova S.B., Slokoska, K.S. Comparison of antioxidant enzyme biosynthesis by free and immobilized *Aspergillus niger* cells. Enzyme Microbiology Technology. 2000; 26: 544–549.
86. Eguia E. Desarrollo de la biopelículas en medio soporte permeable [tesis Doctoral]. Santander: Universidad de Cantabria; 1991.
87. Pozo G., Optimización de la operación de un reactor aeróbico de biopelícula bacteriana inmovilizada: incidencia de los nutrientes en la biosíntesis de polihidroxialcanoato (PPHA) como producto del tratamiento de efluentes de celulosa KRAFT [tesis], Concepción: Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción; 2009.
88. Oram B., [Página principal]. EE UU, Dallas: Water Research Center; c1988-20123 [actualizada 15 febrero 2012; consultado 25 setiembre 2014]. Disponible en: <http://www.water-research.net/index.php/ph-in-the-environment>
89. Standard Methods for he Water And Wasterwater. 19th Edition; 1995.
90. Catalán J., Química del Agua., Madrid: Bellisco ;1990.
91. California Environmental Protection Agency. Folleto Informativo 3.1.3.0 Conductividad Eléctrica/Salinidad.
92. Organización mundial de la Salud, Guías para la calidad de agua potable, 3ra edición, Suiza: OMS 1967 ediciones; 2006. Disponible en http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq3_es_full_lowres.pdf

:

ANEXOS

ANEXO N°1. LÍMITES MÁXIMOS PERMISIBLES DE AGUA PARA CONSUMO HUMANO

Según el DS N° 031-2010-SA. Reglamento de la Calidad del Agua para Consumo Humano, emitido por el Ministerio de salud en el año 2011

Tabla 25: Límites máximos permisibles de parámetros de calidad Organoléptica

Parámetros	Unidad de medida	Límite máximo permisible
1. Olor	—	Aceptable
2. Sabor	—	Aceptable
3. Color	UCV escala Pt/Co	15
4. Turbiedad	UNT	5
5. pH	Valor de pH	6,5 a 8,5
6. Conductividad (25°C)	µmho/cm	1 500
7. Sólidos totales disueltos	mg L ⁻¹	1 000
8. Cloruros	mg Cl ⁻ L ⁻¹	250
9. Sulfatos	mg SO ₄ ⁼ L ⁻¹	250
10. Dureza total	mg CaCO ₃ L ⁻¹	500
11. Amoníaco	mg N L ⁻¹	1,5
12. Hierro	mg Fe L ⁻¹	0,3
13. Manganeso	mg Mn L ⁻¹	0,4
14. Aluminio	mg Al L ⁻¹	0,2
15. Cobre	mg Cu L ⁻¹	2,0
16. Zinc	mg Zn L ⁻¹	3,0
17. Sodio	mg Na L ⁻¹	200

UCV = Unidad de color verdadero
UNT = Unidad nefelométrica de turbiedad



Tabla 26: Límites máximos permisibles de parámetros químicos Inorgánicos y orgánicos

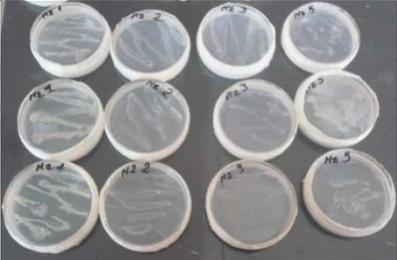
Parámetros Inorgánicos	Unidad de medida	Límite máximo permisible
1. Antimonio	mg Sb L ⁻¹	0,020
2. Arsénico (nota 1)	mg As L ⁻¹	0,010
3. Bario	mg Ba L ⁻¹	0,700
4. Boro	mg B L ⁻¹	1,500
5. Cadmio	mg Cd L ⁻¹	0,003
6. Cianuro	mg CN ⁻ L ⁻¹	0,070
7. Cloro (nota 2)	mg L ⁻¹	5
8. Clorito	mg L ⁻¹	0,7
9. Clorato	mg L ⁻¹	0,7
10. Cromo total	mg Cr L ⁻¹	0,050
11. Flúor	mg F L ⁻¹	1,000
12. Mercurio	mg Hg L ⁻¹	0,001
13. Niquel	mg Ni L ⁻¹	0,020
14. Nitratos	mg NO ₃ L ⁻¹	50,00
15. Nitritos	mg NO ₂ L ⁻¹	3,00 Exposición corta 0,20 Exposición larga
16. Plomo	mg Pb L ⁻¹	0,010
17. Selenio	mg Se L ⁻¹	0,010
18. Molibdeno	mg Mo L ⁻¹	0,07
19. Uranio	mg U L ⁻¹	0,015

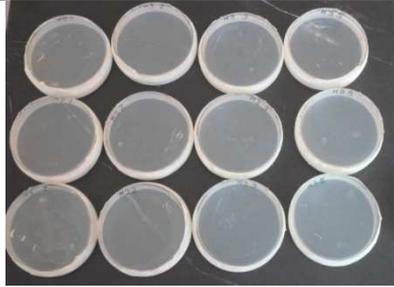
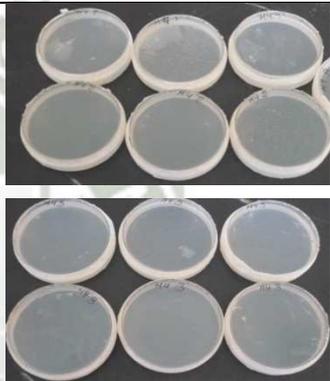
Nota 1: En caso de los sistemas existentes se establecerá en los Planes de Adecuación Sanitaria el plazo para lograr el límite máximo permisible para el arsénico de 0,010 mgL⁻¹

Nota 2: Para una desinfección eficaz en las redes de distribución la concentración residual libre de cloro no debe ser menor de 0,5 mgL⁻¹.

ANEXO N°2. GALERÍA DE FOTOS DE LAS PRUEBAS DE ADAPTABILIDAD

Tabla 27: Galería de fotos de la de la prueba de resistencia en placa a los 3 días de siembra.

	CAs1	CAs2	CAs3	CAs5	
M1	+++	+++	+++	+++	
M2	+++	+++	+++	+++	
M3	+++	+++	+++	+++	
M4	+++	---	+++	+++	
M5	++-	---	+++	+++	

M6	---	---	---	---	
M7	---	---	+++	+++	
M8	---	---	---	---	

ANEXO N°3.COMPOSICIÓN DE LOS MEDIOS UTILIZADOS

a. Agar soya tripticasa

Peptona de caseína	15 g
Peptona de harina de soya	5,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Agar	15 g
Agua	1000 ml

b. Caldo Nutritivo

Extracto de carne	3 g
Pluripeptona	5 g
Agua	1000 ml

c. Base para Agar Sangre

Infusión de músculo de corazón	375 g
Cloruro de sodio	5g
Peptona	10g
Agar	15 g
Agua	1000 ml

d. Agar plate count

Triptosa	5.0 g
Dextrosa	1.0 g
Extracto de levadura	2.5g
Agar	12 g
Agua	1000 ml

e. Agar manitol salado

Peptona	10 g
Extracto de carne	1g
Cloruro de sodio	75 g
D(-) manitol	10 g

Rojo de fenol	0,025 g
Agar-Agar	15 g
Agua destilada csp	1000.0 ml

f. Prueba de la catalasa

Peróxido de hidrógeno al 30%

g. Agar Mac Conkey

Peptona de caseína	7 g
Lactosa	10 g
Peptona de tejido animal	3 g
Sales biliares	1,5 g
Cloruro de sodio	5 g
Rojo neutro	0,03 g
Cristal violeta	0,001g
Agar-Agar	12,5 g
Agua destilada csp	1000 ml

h. Agar triple azúcar hierro (TSI)

Extracto de carne	3g
Extracto de levadura	3 g
Peptona	15g
Proteosa peptona	5 g
Lactosa	10 g
Dextrosa	10 g
Sucrosa	10 g
Cloruro de sodio	5g
Sulfato ferroso	0,2 g
Tiosulfato de sodio	0,3 g
Agar	12 g
Rojo fenol	0,024 g

i. Ureasa

Peptona	1 g
Cloruro de sodio	5 g
Glucosa	1g
Fosfato monopotásico	2g
Urea	20 g
Rojo fenol	0,012 g
Agar	15 g
Agua	1000 ml

j. Medio gelatina nutritiva

Extracto de carne de res	3 g
Gelatina	120 g
Peptona de gelatina	5 g
Agua	1000 ml

k. Caldo tioglicolato

Tripteína	17 g
Peptona de soya	3 g
Glucosa	6 g
Cloruro de sodio	2 g
Tioglicolato de sodio.	0,5 g
L-cistina	0,25g
Sulfito de sodio.	0,1 g
Agar.	0,7 g
Agua	1000 ml

l. Caldo Nitrato

Peptona	5 g
Extracto de carne	3 g
Nitrato potásico	1 g
Agua destilada	1000 ml

m. Medio Hugh Leifson.

Tripteína.	2 g
Cloruro de sodio	5 g
Fosfato dipotásico	0,30 g
Azul de bromotimol	0,03 g
Agar	2,50 g
Agua	1000 ml

n. Medio Leche Litmus

Leche en polvo descremada	100 g
Tornasol	0,075 g
Agua destilada	1000ml

o. Reactivo de Kovacs (Prueba Oxidasa)

Para-dimetil-amino-Benzaldehído.	1 g
Alcohol amílico ó butílico	80 ml
Ácido clorhídrico químicamente puro	20 ml

ANEXO N°4. CERTIFICACIÓN

Este anexo presenta el certificado del laboratorio LAS que realizó la determinación de Arsénico Total del Geiser Coalaque.



Laboratorios Analíticos del Sur

Parque Industrial Río Seco C-1 Cerro Colorado
Arequipa Perú / Apartado 2102

Telf: (054) 443294 Fax: (054) 444582 www.laboratoriosanaliticosdelsur.com

INFORME DE ENSAYO LAS-12-05837

Pág: 1/1

Hoja de datos

Señores: Begonia Rodriguez
 Dirección: Renato Morales 115 Yanahuara Arequipa
 Atención: Rosmary Rebaza Peñafiel
 Proyecto: -

Producto(s) Declarado(s): Agua Subterránea o Subsuelo
 Nro de muestras: 1
 Muestreo a cargo de(l): Begonia Rodriguez
 Registro de muestreo: H.C.C.N° 123-12
 Fecha de recepción: 14/09/2012
 Fecha de ensayo: 14/09/2012
 Fecha de emisión: 27/09/2012
 Condiciones de recepción de la muestra: Temperatura Ambiente
 Observaciones :

Metodo de ensayo aplicado
 *813 ASTM D 2972 - 03 Método de ensayo estándar para Arsénico en agua por Generación de Hidruros

Cod Int. #	Nombre de muestra	Lugar de muestreo	Punto de muestreo y/o coordenadas UTM Este / Norte	Fecha de muestreo	Hora de muestreo	802 As mg/L
AG12000360	GEISER COALAUQUE	Geiser/Coloaque/Sanche Cerro/Moquegua	Geiser	12/09/12	11:30 a.m.	24.2



Laboratorios Analíticos del Sur E.I.R.L.
Omar A. Arez Soto
 Gerente
 M. Sc. Ingeniero Químico CIP 114426

Asimismo los certificados del laboratorio de control de calidad de la UCSM que con la determinación de Arsénico total de la prueba del sistema del agua de Punta de Bombón



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS, BIOQUÍMICAS Y BIOTECNOLÓGICAS
LABORATORIO DE ENSAYO Y CONTROL DE CALIDAD



Urb. San José S/N Umacollo CAMPUS UNIVERSITARIO H-204/205 ☎ +51 54 251210 ANEXO 1166
✉ laboratorioensayoucsm@gmail.com 🌐 http://www.ucsm.edu.pe 📄 Apto. 1350
AREQUIPA - PERU



INFORME DE ENSAYO
N° DE INFORME: ANA06L13.001034B

Nombre del Cliente : BEGONIA LUCIA RODRIGUEZ RIVERA
Dirección del Cliente : RENATO MORALES 115 UMACOLLO
RUC : NO DECLARA
Condición del Muestreado : POR EL CLIENTE
Descripción : AGUA SUPERFICIAL
Tamaño de muestra : 150 mL
Fecha de Recepción : 06/12/2013
Fecha de Inicio del Ensayo : 06/12/2013
Fecha de Emisión de Informe : 12/12/2013
Página : 1 de 1

I. ANALISIS FISICO – QUIMICO:

ANÁLISIS	RESULTADO
DETERMINACIÓN DE ARSENICO (mg/L) Determination of Metals and Trace Elements in Water and Wastes by Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectrometry EPA METHOD 200.7 *	
001034 a (M1-1)	0,080
001034 b (M1-2)	0,077
001034 c (M2-1)	0,984
001034 d (M2-2)	0,975
001034 e (M2-3)	0,983
001034 f (M3-1)	0,956
001034 g (M3-2)	0,957
001034 h (M3-3)	0,961
001034 i (M4-1)	0,933
001034 j (M4-2)	0,960

OBSERVACIONES:

Este documento al ser emitido sin el símbolo de acreditación, no se encuentra dentro del marco de la acreditación otorgada por INDECOPI-CRT

Q.F. Ricardo A. Abril Ramirez
CQFIDA 00624
JEFE DE LABORATORIO LECC



Los resultados emitidos en el presente informe se relacionan únicamente a las muestras ensayadas. Este documento no debe ser reproducido, sin autorización escrita del Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS, BIOQUÍMICAS Y BIOTECNOLÓGICAS
LABORATORIO DE ENSAYO Y CONTROL DE CALIDAD



Urb. San José S/N Umacollo CAMPUS UNIVERSITARIO H-204/205 ☎ +51 54 251210 ANEXO 1166
✉ laboratorioensayoucsm@gmail.com 🌐 http://www.ucsm.edu.pe 📍 Aptdo. 1350
AREQUIPA - PERU



INFORME DE ENSAYO
N° DE INFORME: ANA06L13.001034

Nombre del Cliente : BEGONIA LUCIA RODRIGUEZ RIVERA
Dirección del Cliente : RENATO MORALES 115 UMACOLLO
RUC : NO DECLARA
Condición del Muestreado : POR EL CLIENTE
Descripción : AGUA SUPERFICIAL
Tamaño de muestra : 150 mL
Fecha de Recepción : 06/12/2013
Fecha de Inicio del Ensayo : 06/12/2013
Fecha de Emisión de Informe : 12/12/2013
Página : 1 de 1

I. ANÁLISIS FÍSICO – QUÍMICO:

ANÁLISIS	RESULTADO	
	Muestra m1-3	Muestra m4-3
DETERMINACIÓN DE METALES TOTALES (mg/L) Determination of Metals and Trace Elements in Water and Wastes by Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectrometry EPA METHOD 200.7 *		
Aluminio (Al)	0,004	0,022
Antimonio (Sb)	0,009	0,009
Arsénico (As)	0,053	0,800
Bario (Ba)	0,047	0,045
Berilio (Be)	No detectable	No detectable
Bismuto (Bi)	No detectable	No detectable
Boro (B)	5,861	5,777
Cadmio (Cd)	No detectable	0,001
Calcio (Ca)	139,3	137,2
Cobalto (Co)	0,004	0,004
Cobre (Cu)	0,004	0,043
Cromo (Cr)	No detectable	0,001
Estaño (Sn)	0,004	0,006
Estroncio (Sr)	0,877	0,853
Fosforo (P)	0,118	1,474
Hierro (Fe)	0,022	0,006
Litio (Li)	0,786	0,796
Magnesio (Mg)	18,46	24,88
Manganeso (Mn)	0,587	0,475
Molibdeno (Mo)	0,015	0,014
Níquel (Ni)	0,001	0,001
Plata (Ag)	No detectable	No detectable
Plomo (Pb)	0,005	0,005
Potasio (K)	21,04	28,05
Selenio (Se)	0,014	0,016
Silicio (Si)	22,56	21,99
Sodio (Na)	326,7	351,8
Talio (Tl)	No detectable	No detectable
Titanio (Ti)	No detectable	0,001
Vanadio (V)	0,011	0,011
Zinc (Zn)	No detectable	No detectable

OBSERVACIONES:

Este documento al ser emitido sin el símbolo de acreditación, no se encuentra dentro del marco de la acreditación otorgada por INDECOPI-CRT

Q.F. Ricardo A. Abril Ramirez
CQFDA 00624
JEFE DE LABORATORIO LECC



Los resultados emitidos en el presente informe se relacionan únicamente a las muestras ensayadas. Este documento no debe ser reproducido, sin autorización escrita del Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad

ANEXO N° 5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo mediante el uso del programa IBM SPSS Statistics versión 19 para los datos obtenidos en la reducción de agua subterránea adicionada de 1 ppm de arsenito de sodio.

Se realizó la prueba de ANOVA, para determinar si existe diferencia significativa entre los resultados obtenidos para cada tiempo de retención en el sistema MBBR. Al determinar el valor de $P < 0,05$, concluimos que existe diferencia significativa entre los tiempos probados, como se observa en las tablas.

Tabla 28: Descriptivos para cada tiempo de retención en el sistema MBBR

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
,00	3	1,070000	,0147986	,0085440	1,033238	1,106762
5,00	3	,980667	,0049329	,0028480	,968413	,992921
10,00	3	,958000	,0026458	,0015275	,951428	,964572
24,00	3	,897667	,0856524	,0494514	,684894	1,110439
Total	12	,976583	,0745428	,0215187	,929221	1,023946

Tabla 29: Prueba de ANOVA para la concentración de arsénico en agua a diferentes tiempos de retención

Concentración Arsénico

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,046		,015	8,075	,008
Intra-grupos	,015	8	,002		
Total	,061	11			

Tabla 30: Comparación Múltiple entre tiempos de retención en el sistema

(I) Horas	(J) Horas	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
,00	5,00	,0893333	,0355590	,132	-,024539	,203206
	10,00	,1120000	,0355590	,054	-,001873	,225873
	24,00	,1723333*	,0355590	,006	,058461	,286206
5,00	,00	-,0893333	,0355590	,132	-,203206	,024539
	10,00	,0226667	,0355590	,917	-,091206	,136539
	24,00	,0830000	,0355590	,169	-,030873	,196873
10,00	,00	-,1120000	,0355590	,054	-,225873	,001873
	5,00	-,0226667	,0355590	,917	-,136539	,091206
	24,00	,0603333	,0355590	,385	-,053539	,174206
24,00	,00	-,1723333*	,0355590	,006	-,286206	-,058461
	5,00	-,0830000	,0355590	,169	-,196873	,030873
	10,00	-,0603333	,0355590	,385	-,174206	,053539

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

Tabla 31: HDS Tukey

Horas	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
24,00	3	,897667	
10,00	3	,958000	,958000
5,00	3	,980667	,980667
,00	3		1,070000
Sig.		,169	,054

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

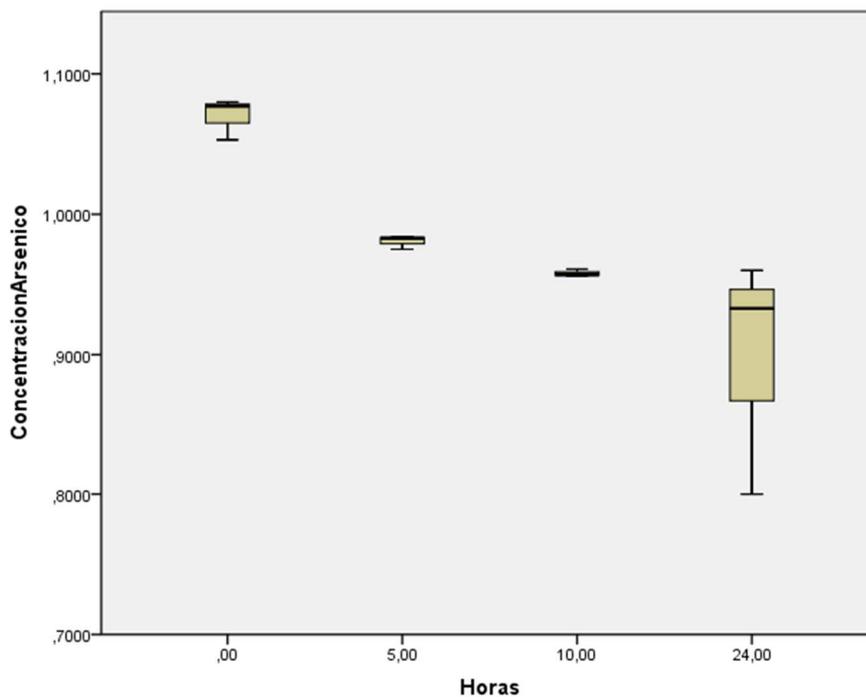


Figura 36: Grafica de caja bigotes

Tabla 32: Estadístico número de muestras, media, desviación estándar y error típico para los parámetros evaluados respecto a la calidad del agua.

Estadísticos para una muestra

	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
pH	2	7,1800	,28284	,20000
Temperatura	2	10,8450	,86974	,61500
Conductividad	2	1111,5000	161,92745	114,50000
Sólidos Totales Disueltos	2	555,5000	81,31728	57,50000
Porcentaje de salinidad	2	,5050	,14849	,10500
Oxígeno disuelto	2	2,9000	,14142	,10000
Turbiedad	2	112,5000	3,53553	2,50000
Cloruros	2	591,9250	82,48401	58,32500
Sulfatos	2	632,7700	22,66984	16,03000
Dureza Total	2	664,7400	43,33150	30,64000

Tabla 33: Prueba de test de hipótesis para los parámetros monitoreados de calidad de agua antes y después de 24 horas de tratamiento

	Valor de prueba = 0					
	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
					Inferior	Superior
pH	35,900	1	,018	7,18000	4,6388	9,7212
Temperatura	17,634	1	,036	10,84500	3,0307	18,6593
Conductividad	9,707	1	,065	1111,50000	-343,3604	2566,3604
Solidos Totales Disueltos	9,661	1	,066	555,50000	-175,1068	1286,1068
Porcentaje de salinidad	4,810	1	,131	,50500	-,8292	1,8392
Oxígeno disuelto	29,000	1	,022	2,90000	1,6294	4,1706
Turbiedad	45,000	1	,014	112,50000	80,7345	144,2655
Cloruros	10,149	1	,063	591,92500	-149,1644	1333,0144
Sulfatos	39,474	1	,016	632,77000	429,0895	836,4505
Dureza Total	21,695	1	,029	664,74000	275,4219	1054,0581

